

**INDUKTION, SELEKTIVE ANREICHERUNG,
GENETISCHE UND BIOCHEMISCHE
CHARAKTERISIERUNG ATMUNGSDEFEKTER
MUTANTEN DER SPALTHEFE
SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE L.**

Klaus Wolf

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551925_0004

Aus dem
Institut für Genetik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. F. Kaudewitz

INDUKTION, SELEKTIVE ANREICHERUNG,
GENETISCHE UND BIOCHEMISCHE
CHARAKTERISIERUNG ATMUNGSDEFEKTER
MUTANTEN DER SPALTHEFE
SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE L.

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der
Fakultät für Biologie
der Ludwig- Maximilians- Universität
München

vorgelegt von
KLAUS WOLF
aus Oettingen

München 1973



1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Kaudewitz
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H. Schmieger

Tag der mündlichen Prüfung: 25. 2. 1974

Today he can discover his errors of yesterday and tomorrow he may obtain light on what he thinks himself sure of today.

Moses Maimonides (1135 - 1204)

Zitat in Physics, Psychology and Medicine, von J. H. Woodger
1956, Cambridge University Press

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von 1970 bis 1973 am Institut für Genetik der Universität München, am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Universität Bern und am Centre de Génétique Moléculaire, Gif- sur- Yvette unter Anleitung von Prof. Dr. F. Kaudewitz durchgeführt.

Am Ende dieser Arbeit ist es mir ein echtes Bedürfnis, allen zu danken, die zu ihrer Entstehung beigetragen haben. In erster Linie gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Kaudewitz für die großzügige Förderung dieser Arbeit und Herrn Dr. Schweyen und Herrn Dr. Bandlow für die vielen Ratschläge und wertvollen Diskussionen. Herrn Prof. Dr. Leupold und seiner Gruppe möchte ich hier besonders für seine Einführung in die Genetik von *Schizosaccharomyces pombe* danken. Eine gründliche Einführung in das Gebiet der mitochondrialen Genetik verdanke ich Herrn Prof. Dr. Slonimski und seiner Gruppe. Die Diskussionen mit Herrn Prof. Dr. Suyama, Frau Dr. Somlo, Frau Dr. Labeyrie, Herrn Dr. Fukuhara und Herrn Dr. Michaelis vom Centre de Génétique Moléculaire in Gif- sur- Yvette waren äußerst wertvoll. Herrn Claisse vom selben Institut danke ich für die Hilfestellung bei der Tieftemperatur- Spektroskopie.

Der European Molecular Biology Organization (EMBO) sei gedankt für die Finanzierung des Aufenthaltes in Bern, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung des Frankreichaufenthaltes und der Universität München für die Gewährung eines Graduiertenstipendiums. Frau Kolb und Fräulein Schaffernicht danke ich für die Bereitstellung von experimentellen Ergebnissen aus ihren Diplomarbeiten. Besonderer Dank gilt Frau Pabst für wertvolle technische Assistenz und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Genetischen Institut für ihre Hilfsbereitschaft.

Besondere Zielsetzung der Arbeit

Schizosaccharomyces pombe ist im Vergleich zu Saccharomyces cerevisiae ein in der Hefegenetik relativ junger und wenig verbreiteter Organismus. Unglücklicherweise sind gerade die grundlegenden methodischen Arbeiten an dieser Hefe in Zeitschriften veröffentlicht, welche auch in Universitätsbibliotheken schwerlich zu finden sind. Für alle, welche mit diesem Organismus biochemisch oder genetisch arbeiten, ist der über den üblichen Rahmen ausführliche methodische Teil gedacht, in dem neben ausführlicher Schilderung der Methodik immer noch auf die Primärliteratur hingewiesen wird.

Im Abschnitt "Ergebnisse" werden in ausführlichen Einleitungen immer wieder Parallelen zum Saccharomyces- System gezogen, da einige der Problemstellungen in der vorliegenden Arbeit besser oder nur an diesem Organismus gelöst werden können. Die Arbeit ist in ihrem experimentellen Teil bewußt breit angelegt. Alle Ergebnisse sollten deshalb hauptsächlich als Vorarbeiten für gezielte Untersuchungen von Einzelproblemen gewertet werden. Dies gilt vor allen Dingen für die biochemische Charakterisierung der Mutanten und den Versuch ihrer Kartierung.

Der Teil der Arbeit, welcher sich im Zusammenhang mit den Selektionssystemen für atungsdefekte Mutanten mit mitochondrialer Genetik bei Saccharomyces befaßt, ist in Methodik und Literaturzitaten ebenfalls sehr ausführlich gehalten, da besonders auf dem Gebiet der mitochondrialen

Genetik ein großer Engpaß an publizierter Methodik besteht.

Zahlreiche Reviewartikel befassen sich mit den mitochondrialen Mutanten bei Saccharomyces cerevisiae, konzentrierte Informationen über Arbeiten an karyotischen atmungsdefekten Mutanten sind relativ selten. Eine weitere Aufgabe, welche diese Arbeit erfüllen soll, ist es, die Literatur über diese Mutantengruppe zusammenzufassen, um demjenigen, welcher auf diesem immer wichtiger werdenden Gebiet zu arbeiten beginnt, die Einführung zu erleichtern.

Die Ausführlichkeit der Arbeit sowohl in der Methodik als auch in der Auswahl der Literatur am Ende jedes Abschnitts ist besonders für Diplomanden und Doktoranden dieses Instituts gedacht, um ihnen die Orientierung am Beginn ihrer Arbeit auf einem neuen Gebiet zu erleichtern.

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	4
Nomenklatur	4
Hefestämme	5
Medien für <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	10
Medien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
Genetische Methoden für <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	21
Genetische Methoden für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
Biochemische Methoden	42
Apparate	49
Literaturverzeichnis	50
ERGEBNISSE	57
I. Vorbemerkungen zur Genetik und Physiologie der beiden verwendeten Organismen: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	57
I. 1) Lebenszyklen	57
I. 2) Paarungsstufen	57
I. 3) Wachstum von <i>Schizosaccharomyces pombe</i> auf ver- schiedenen Medien	59
I. 4) Zusammenfassung	61
I. 5) Diskussion	61
I. 6) Literaturverzeichnis	63

II. Mutagene Behandlung	65
II. 1) Mutagene Behandlung mit Nitrosoguanidin	65
II. 2) Mutagene Behandlung mit ultraviolettem Licht	66
II. 3) Mutationsinduktion mit salpetriger Säure	67
II. 4) Mutationsinduktion mit ICR- 170	67
II. 5) Mutationsinduktion auf festem Medium mit ICR- 170, Methylmethansulfonat und Diäthylsulfat unter wach- senden Bedingungen	68
II. 6) Mutation durch ^{32}P - Zerfall	69
II. 7) Mutationsinduktion mit Akriflavin	70
II. 8) Zusammenfassung	70
II. 9) Diskussion	70
II.10) Literaturverzeichnis	73
III. Die genetische Natur der Atmungsdefizienz bei Schizosaccharomyces pombe	81
III. 1) petite- positive und petite- negative Hefen	81
III. 2) Atmungsdefekte Mutanten bei Saccharomyces cere- visiae	81
III. 3) Genetische Analyse der petites bei Schizosaccha- romyces pombe	85
III. 4) Zusammenfassung	88
III. 5) Diskussion	89
III. 6) Literaturverzeichnis	91
IV. Anreicherungsverfahren für atmungsdefekte Mutanten ...	96
IV. 1) Anreicherung durch Abtötung wachsender Zellen	96
IV. 2) Anreicherung atmungsdefekter Mutanten durch Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	98

IV. 3) Anreicherung atmungsdefekter Mutanten durch	
Cobaltsulfat	102
IV. 4) Zusammenfassung	109
IV. 5) Diskussion	110
IV. c) Literaturverzeichnis	117
V. Physiologische Eigenschaften der atmungsdefekten	
Mutanten von <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	123
V. 1) Wachstum atmungsdefekter Mutanten	123
V. 2) Osmotische Heilbarkeit und Temperatursensitivität ..	125
V. 3) Einfluß der Atmungsdefizienz auf die Adenin-	
biosynthese	126
V. 4) Zusammenfassung	127
V. 5) Diskussion	127
V. 6) Literaturverzeichnis	129
VI. Biochemische Klassifizierung der atmungsdefekten	
Mutanten von <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	130
VI. 1) Die mitochondriale Atmungskette	130
VI. 2) Cytochromspektren bei <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
und <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	133
VI. 3) Enzymtests zur Lokalisierung der Defekte in	
der Atmungskette	136
VI. 4) Biochemische Eigenschaften der ρ^- - Mutante	
von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	137
VI. 5) Atmungsdefekte karyotische Mutanten von <i>Schizo-</i>	
<i>saccharomyces pombe</i> mit ρ^- - Phänotyp	138
VI. 6) Klassifizierung genischer atmungsdefekter	
Mutanten von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	139

VI. 7) Cytochrom c in Wildtyp und atmungsdefekten	
Mutanten von Schizosaccharomyces pombe	141
VI. 8) Mutanten mit Defekten in Komplex I und/oder II	
und ihre Pleiotropie	142
VI. 9) Mutanten mit Defekten in Coenzym Q und	
Komplex III	143
VI. 10) Mutanten mit Defekten in Komplex IV	145
VI. 11) Mutanten mit gesteigerten Enzymaktivitäten	146
VI. 12) Versuch einer Gliederung der Mutanten	146
VI. 13) Zusammenfassung	147
VI. 14) Diskussion	148
VI. 15) Literaturverzeichnis	155
 VII. Weitere genetische Untersuchungen an atmungsdefekten	
Mutanten von Schizosaccharomyces pombe:	
Reversion, Komplementation und Rekombination	163
VII. 1) Rückmutation und Reversion bei atmungsdefekten	
Mutanten von Schizosaccharomyces pombe	163
VII. 2) Genetische und biochemische Untersuchungen an	
einer atmungsdefekten Doppelmutante	166
VII. 3) In vivo- Komplementation cytochromoxidase-	
defekter Mutanten	167
VII. 4) Alleliebeziehungen unter atmungsdefekten	
Mutanten	169
VII. 5) Zusammenfassung	171
VII. 6) Diskussion	171
VII. 7) Literaturverzeichnis	174

SCHLUSSDISKUSSION	175
Literaturverzeichnis	180

ZUSAMMENFASSUNG DER WICHTIGSTEN ARBEITEN ÜBER CHROMO-	
SOMALE ATMUNGSDEFEKTE MUTANTEN BEI HEFE	182

FIGUREN UND TABELLEN	siehe 2. Teil
----------------------------	---------------

E I N L E I T U N G

Mitochondrien sind zwar selbst Träger genetischer Information, doch ist die Anzahl der Proteine, welche von ihrer DNS kodiert werden, relativ klein. Es ist bekannt, daß eine große Zahl mitochondrialer Enzyme kernkodiert sind: mehr als 60 verschiedene Kerngene sind heute beschrieben, welche mitochondriale Funktionen betreffen.

Obwohl Ephrussi (1953) in seiner klassischen Studie über die extrachromosomale Vererbung des Atmungsdefekts bei Bäckerhefe die Bedeutung der Wechselwirkung von Kern und Mitochondrien besonders betonte, stand die Erforschung der karyotischen Faktoren der Atmungsdefizienz immer im Schatten der Untersuchungen über die ρ^- -Mutation. Für Aussagen über die Funktion der mitochondrialen Atmungskette war die ρ^- -Mutante jedoch nur von sehr begrenztem Wert, da es sich bald herausstellte, daß alle extrakaryotisch vererbten Atmungsdefekte der Bäckerhefe denselben Phänotyp, nämlich den Ausfall aller membrangebundenen Cytochrome, zeigten.

Mehr als 15 Jahre nach der Entdeckung der Kleinkoloniemutante wandte man sich, abgesehen von einigen Ausnahmen, der Suche nach karyotischen Mutanten der Atmungsdefizienz zu. Es war einerseits zu erwarten, andererseits enttäuschend, auch unter den karyotischen Mutanten der Bäckerhefe hauptsächlich den wohlbekannten ρ^- -Phänotyp vorzufinden. Erst die genaue Charakterisierung einer größeren Anzahl Kernmutanten enthielt eine Vielfalt von Phänotypen, wodurch die karyotischen Mutanten

für biochemische Untersuchungen an der Atmungskette immer mehr an Bedeutung gewannen. Die Arbeit mit diesen Mutanten war jedoch oft dadurch erschwert, daß viele unter Einfluß der karvotischen Mutation teilweise oder ganz zum ρ^- - Zustand weitermutierten und so die genetische Arbeit sehr schwierig gestalteten.

Ein wichtiges Ergebnis der intensiven Forschung über die Entstehung extrachromosomaler petites war, daß sie in wesentlich größerer Anzahl als andere Mutationen spontan auftreten und durch eine Reihe von Agenzien, wie erhöhte Temperatur, Hitze, Antibiotica, die klassischen Mutagene, besonders leicht aber durch Acriflavin und Ethidiumbromid induziert werden konnten. Die nahezu quantitative Induktion von petites durch Acriflavin machte sich Bulder (1964) für eine systematische Suche nach Hefe zunutze, welche diese petite- Bildung nicht zeigen. Neben einer Gruppe von Hefen, welche sich nach Acriflavinbehandlung wie Saccharomyces verhielten, fand er eine andere, bei deren Vertretern keine at- mungsdefekten Mutanten induziert werden konnten. In diese Ver- suchsserie wurde von Bulder auch Schizosaccharomyces pombe einbe- zogen, ein Organismus, welcher von Leupold (1950) in die geneti- sche Forschung eingeführt worden war. Für Schizosaccharomyces fand Bulder intermediäres Verhalten, nämlich das Auftreten we- niger atungsdefekter Kolonien. Bulder klassifizierte die weni- gen Atmungsdefekten aufgrund ihres ρ^- - Spektrums als extraka- ryotische petites, stellte aber Schizosaccharomyces wegen der extrem geringen Mutationsrate zu petite näher zur petite- ne- gativen Gruppe. Der stürmische Fortschritt im Aufbau eines ka- ryotischen und mitochondrialen genetischen Systems bei Saccha- romyces cerevisiae brachte es mit sich, daß sich relativ wenige

Gruppen den petite- negativen Hefen zuwandten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu klären, ob bei Schizosaccharomyces pombe ebenso wie bei Saccharomyces cerevisiae sowohl chromosomal als auch extrachromosomal vererbte petites induziert werden können. Dabei mußten sich zwei verschiedene Arbeitsrichtungen ergeben, welche sich aus der Beantwortung der ersten Fragestellung ableiten lassen.

1) Treten beide Arten von petites auf, so wären die cytoplasmatischen petites von großem Interesse. Da diese petites, verglichen mit Saccharomyces cerevisiae, nach Acriflavinbehandlung in sehr geringer Zahl auftreten, müßten sie durch einen zumindest quantitativ unterschiedlich arbeitenden Mechanismus als bei Saccharomyces cerevisiae entstanden sein.

2) Entstehen nur karyotisch vererbte petites, so wäre Schizosaccharomyces pombe der Organismus der Wahl für Untersuchungen an der Atmungskette ohne die Bürde der sekundär entstehenden rho⁻ petites.

Ziel der Arbeit war es, mit verschiedenen Mutagenen atmungsdefekte Mutanten bei Schizosaccharomyces pombe zu induzieren und Anreicherungsverfahren für ihre Selektion zu entwickeln. Diese petites sollten dann genetisch und biochemisch charakterisiert werden.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

N O M E N K L A T U R

Die Bezeichnung der Wildtypstämme und Mutanten richtet sich nach den in "Yeast Genetics Supplement of the Microbial Genetics Bulletin No 31, Nov.1969 (Biology Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee) veröffentlichten Vorschlägen: pet bezeichnet ein rezessives Kerngen, das die Unfähigkeit, auf nichtvergärbarem Substrat zu wachsen, bedingt, PET dagegen das Wildtypallel. Die Symbole ρ^+ und ρ^- bezeichnen die Anwesenheit bzw. Abwesenheit des funktionsfähigen mitochondrialen Genoms. Die Paarungstypallele werden bei Saccharomyces cerevisiae mit a und alpha, bei Schizosaccharomyces pombe mit h^- , h^+ und h^{90} bezeichnet. Die als C_{321}^R bezeichnete Mutation (zur Chloramphenicol-Resistenz) ist eine Mutation am R I - Locus, E_{221}^R (Erythromycin-Resistenz) eine Mutation am R III - Locus (Netter et al., 1973), O_1^R und O_{144}^R (Oligomycin - Resistenz) sind Mutationen am O I bzw. O II - Locus (Avner et al., 1973) und P_{454}^R (Paromomycin - Resistenz) eine Mutation am P I - Locus (Wolf et al., 1973). C^R und C^S sind allele Formen des R I - Locus, welcher die Resistenz bzw. Sensitivität gegen Chloramphenicol bedingt. C^O , E^O und O^O bezeichnen Deletionen im mitochondrialen Genom, welche die entsprechenden Loci betreffen.

H E F E S T Ä M M E

I. Schizosaccharomyces pombe

1.) haploide Stämme

a) Wildtypen:

972 h^- (heterothallisch)

975 h^+ (heterothallisch)

968 h^{90} (homothallisch)

b) auxotrophe Mutanten:

L 107 h^+ ade 1

47// 1 s h^- ade 6

623 h^+ ade 6

250 h^+ ade 6

L 702 h^- ade 6

M 216 h^- ade 6

M 210 h^+ ade 6

88 h^+ his 2

245// 15 his 2

32// 8 d h^- leu 1

171 h^- ura 1

Diese Mutanten und die 3 Wildtypstämme wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. U. Leupold, Bern, zur Verfügung gestellt.

c) atmungsdefekte Mutanten:

pet 1 h^-

pet 2 h^-

pet 3 h^-

Diese Mutanten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. C. J. E. A. Bulder, Delft, zur Verfügung gestellt.

2.) diploider Stamm

M 210/M 216 h^-h^-

Dieser Stamm wurde aus den haploiden Stämmen M 210 h^+ ade 6 und M 216 h^- ade 6 (komplementierende Allele) synthetisiert und freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. U. Leupold zur Verfügung gestellt.

II. *Saccharomyces cerevisiae*

1.) haploide Stämme

a) atmungskompetente Stämme:

Stamm	Paarungstyp	Kerngenom	Omega-Allel	mitochondriales Genom	Herkunft
A 1328	a	ade2, leu1	nicht bestimmt	C ^S E ^S O ^S P ^S	Seattle Yeast Stock Culture
M 12	a	ile5, trp2, ura3, aux ⁻	-	C ^S E ^S O ^S P ^S	N. S. Kakar
55R5-3C	a	ura1	+	C ^S E ^S O ^S P ^S	H. Jakob
IL 166-4B	a	ura1	+	C ^S E ^S O ^S P ^S	P. P. Slonimski
IL 125-2D	a	ura1	-	C ^S E ^S O ^S P ^S	P. P. Slonimski
IL 187-4C	a	ura1	+	C ^R ₃₂₁ E ^S O ^S P ^S	P. P. Slonimski
IL 164-6B	a	ura1	+	C ^R ₃₂₁ E ^S O ^S P ^S	P. P. Slonimski
IL 102-5D	a	his1, trp1	-	C ^S E ^R ₂₂₁ O ^S P ^S	P. P. Slonimski
D22/A15	a	ade2	+	C ^S E ^S O ^S P ^S ₁₄₄	P. Avner
M12/54	a	ile5, trp2, ura3, aux ⁻	-	C ^S E ^S O ^S P ^R ₄₅₄	R. Kutzleb
IL 458-1A	alpha	his1	+	C ^R ₃₂₁ E ^R ₂₂₁ O ^S P ^S	P. P. Slonimski
IL 8-4C	a	his1	+	C ^R ₃₂₁ E ^R ₅₁₄ O ^S P ^S	P. P. Slonimski

! 6
!

IL 126-3C	a	ural	-	$C_{321}^{R}E_{221}^{R}O_{P}^{S}P^{S}$	P. P. Slonimski
IL 781-4D	alpha	his1	+	$C_{321}^{R}S_{0P}^{R}P^{S}$	P. Avner
IL 902-2C	alpha	his1	+	$C_{321}^{R}E_{0P}^{S}P^{R}$	K. Wolf
IL 780-7A	alpha	his1	-	$C_{321}^{R}E_{0P}^{S}P^{R}454$	P. Avner
IL 216-1D	a	his1, trp1	+	$C_{E221}^{S}R_{0P}^{R}P^{S}$	P. P. Slonimski
IL 779-2B	alpha	his1	+	$C_{E221}^{S}R_{0P}^{R}P^{S}$	P. P. Slonimski
IL 973-7D	alpha	his1	+	$C_{E221}^{S}R_{0P}^{R}P^{R}454$	K. Wolf
IL 828-4B	alpha	his1	+	$C_{321}^{R}E_{221}^{R}O_{P}^{R}P^{S}$	P. Avner
PS 228-1A	alpha	ade2	-	$C_{321}^{R}E_{221}^{R}O_{P}^{R}P^{S}144$	P. Avner

b) mitochondriale atmungsdefekte Mutanten (ρ^-):

IL 828-4B/271/41/1	alpha his1, ura1 omega	$C^O E^O O^R_1$
IL 16-10B/B1	alpha his1	omega $C^O E^O S^O_0$
IL 8-8C/E4/1	alpha his1, trp1	$C^O E^R O^O$
IL 8-8C/614/2	alpha his1, trp1	$C^O E^R O^S$
IL 126-2A/52	alpha ura1	$C^O E^O O^O$
IL 16-10B/B5/1	alpha his1	$C^R E^O S^O_0$
IL 8-8C/D6/1	alpha his1, trp1	$C^R E^O O^O$
IL 8-8C/R5/3	alpha his1, trp1	$C^R E^R O^O$

Diese Petites wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. P. P. Slonimski, Gif-sur-Yvette, zur Verfügung gestellt.

c) Die chromosomal atmungsdefekte Mutante op1 alpha ade3-6, me1 wurde freundlicherweise von Frau Dr. M. Somlo, Gif-sur-Yvette, zur Verfügung gestellt.

2.) Diploide Stämme

a) Diploide aus der Kreuzung

M12/54 omega $C^S E^S O^S P^R_{454}$ x IL 780-7A omega $C^S E^R_{221} O^R_1 P^S$

Kerngenom der Diploiden:	a	ile5	trp2	ura3	aux ⁻	+
	alpha	+	+	+	+	his1

Davon wurden durch mitotische Segregation folgende Diploide abgeleitet.

<u>Diploide</u>	<u>mitochondriales Genom</u>
IL 989	$E^R O^R P^S$
IL 990	$E^R O^S P^S$
IL 991	$E^S O^S P^R$
IL 992	$E^S O^S P^S$
IL 993	$E^R O^R P^R$
IL 994	$E^R O^S P^R$
IL 995	$E^S O^R P^S$
IL 997	$E^S O^R P^R$

b) Diploider Paarungstyp- Testerstamm

WY 91 alpha arg^- , leu^- (leaky) aus der Sammlung von
Prof. Dr. P. P. Slonimski (Gif-sur-Yvette)

M E D I E N U N D P U F F E R

A) Medien für Schizosaccaromyces pombe

I. Vollmedien

1.) Hefeextrakt- Glucose- Medium (YE-Glu) (Leupold, 1955)

Hefeextrakt	5 g
Glucose	30 ml
H ₂ O bidest.	ad 1 l

2.) Hefeextrakt- Glycerin- Medium (YE-Gly) (Wolf et al., 1971)

Wie oben, jedoch 30 ml Glycerin als Kohlenstoffquelle

3.) Malzextrakt- Medium (ME) (Leupold, 1955)

Malzextrakt	30 g
H ₂ O bidest.	ad 1 l

Für die Herstellung von festen Nährböden (YEA-Glu, YEA-Gly, MEA) werden 2 % Agar zugesetzt.

Abwandlungen der Vollmedien

a) nach Mitchison (Mitchison, 1967)

wie oben, jedoch zusätzlich 0,21 % KH₂PO₄

b) nach Foury und Goffeau (Foury und Goffeau, 1972)

Der pH der Medien wird mit 10 n Salzsäure auf 4,5 eingestellt.

II. Minimalmedien

1.) Synthetische Minimalmedien

siehe Tabelle

Anmerkungen zu den synthetischen Minimalmedien

- a) Das Edinburgh- Minimalmedium Nr. 1 (EMM 1) ist identisch mit dem in der Tabelle aufgeführten Edinburgh- Minimalmedium Nr. 2 (EMM 2) (Mitchison, 1970) mit Ausnahme des niedrigeren Gehaltes an NaH₂PO₄ (10 mg/l).

- b) Die Edinburgh- Minimalmedien EMM 1 und EMM 2, das Minimalmedium nach Leupold und das Minimalmedium nach Olson und Johnson werden zur Kultur von Schizosaccharomyces pombe angewandt; das Minimalmedium nach Wickerham kann sowohl für Saccharomyces cerevisiae als auch für Schizosaccharomyces pombe verwendet werden.
- c) Die Salze (außer CaCl_2) werden als Stammlösung 10fach konzentriert angesetzt und autoklaviert.
- d) CaCl_2 wird getrennt von den übrigen Salzen autoklaviert und erst nach dem Erkalten mit ihnen vermischt.
- e) Die Spurenelemente werden als Stammlösung 1000fach konzentriert angesetzt und filtersterilisiert.
- f) Die Vitamine (außer Biotin) werden als Stammlösung 1000fach angesetzt und autoklaviert.
- g) Biotin wird 1000fach konzentriert in 50%igem Äthylalkohol angesetzt.
- h) Der pH der Edinburgh- Minimalmedien liegt bei 5,0 - 5,5, beim Leupold- Minimalmedium etwa bei 5,5 - 6,0; beim Minimalmedium nach Olson und Johnson wird er mit Phosphorsäure auf 5,0 eingestellt.
- i) Beim Minimalagar nach Leupold (Leupold, persönliche Mitteilung) reduziert man die Konzentration an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf 35 g/l und läßt L-Asparagin aus.
- k) Anstatt des Filtersterilisierens und Autoklavierens kann man die einzelnen Stammlösungen auch chemisch sterilisieren. (Mitchison, 1970) Man gibt geringe Mengen eines Gemisches aus 2 Teilen Chlorbutan, 1 Teil Chlorbenzol und 1 Teil 1,2-Dichloräthan zu den Lösungen und bewahrt sie im Kühlraum auf. Vor dem Autoklavieren des kompletten Mediums wird auf etwa 90°C erhitzt, um das Konservierungsmittel zu verdampfen.
- l) Um das Schäumen bei Flüssigkulturen und die Blasenbildung beim Gießen von Platten zu verhindern, werden dem Medium vor dem Autoklavieren einige Tropfen Antischaum- Emulsion SE (Wacker) zugesetzt.

1.) Synthetische Minimalmedien

	Edinburgh-Minimal- medium (Mitchison, 1970)	Minimalmedium nach Leupold (Leupold, 1955)	Minimalmedium nach Olson und Johnson (Olson und Johnson, 1949)	Minimalmedium nach Wickerham (Wickerham, 1946)
<u>Kohlenstoffquelle</u>				
Glucose	10 g	10 g	10 g	30 g
<u>Stickstoffquelle</u>				
NH ₄ Cl	5 g	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	3,5 g	-	5 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	6 g	-
<u>Phosphatquelle</u>				
NaH ₂ PO ₄	300 mg	-	-	-
KH ₂ PO ₄	-	100 mg	200 mg	4,37 g
K ₂ HPO ₄	-	-	-	625 mg
<u>Salze</u>				
Na-acetat	1 g	-	-	-
KCl	1 g	-	-	-
NaCl	-	100 mg	-	500 mg
MgCl ₂	500 mg	-	-	-
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	-	500 mg	250 mg	2,5 g
Na ₂ SO ₄	10 mg	-	-	-

$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	10 mg	150 mg	-	100 mg
L-Asparagin	-	150 mg	2,5 g	-
Zitronensäure	1 mg	-	-	-
Na-citrat	-	-	1 g	-
<u>Vitamine</u>				
Mesoinosit	10 mg	1 mg	10 mg	2 µg
Nicotinsäure	10 mg	100 µg	-	-
Ca- pantothenat	1 mg	100 µg	500 µg	400 µg
Biotin	10 µg	1 µg	20 µg	2 µg
Thiamin	-	-	4 mg	400 µg
Pyridoxin	-	-	1 mg	400 µg
Riboflavin	-	-	-	400 µg

Spurenelemente

H_2Bo	500 µg	500 µg	-	500 µg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	400 µg	400 µg	-	-
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	400 µg	400 µg	400 µg	3,5 mg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	200 µg	200 µg	-	2,5 mg
$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	-	-	150 µg	-
$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	100 µg	-	-	-
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	-	1 mg	-	-
KJ	100 µg	100 µg	-	500 µg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	40 µg	40 µg	25 µg	500 µg
<u>H_2O bidest.</u>	ad 1 l	ad 1 l	ad 1 l	ad 1 l
<u>Agar</u>	2 %	2 %	2 %	2 %

2.) Semisynthetisches Minimalmedium (Johnson, 1967)

Difco Yeast Nitrogen Base	6,7 g
L- Asparagin	200 mg
und/oder KH_2PO_4	5 g
Glucose	20 g
H_2O bidest.	ad 1 l

Anmerkung: Der Zusatz von L- Asparagin oder KH_2PO_4 ist wichtig, da sonst etwa die Hälfte der Zellen bei der letzten Teilung vor der stationären Phase lysiert (Johnson, 1967).

Supplementierte Minimalmedien

Den synthetischen und semisynthetischen Minimalmedien können folgende Wachstumsfaktoren zugegeben werden:

Adenin	100 mg/l
Histidin	100 mg/l

Alle anderen Supplementierungen sind dieselben wie für Saccharomyces cerevisiae.

III. Sporulationsmedien

1.) Malzextrakt- Medium (Leupold, 1955)

siehe Vollmedien

2.) Synthetisches Sporulationsmedium (Munz und Leupold, 1970)

Glucose	10 g
KH_2PO_4	1 g
Ca- pantothenat	1 mg
Nicotinsäure	1 mg
Mesoinosit	10 mg
Biotin	10 μg
Agar	30 g
H_2O bidest.	ad 1 l

B) Medien für *Saccharomyces cerevisiae*

I. Vollmedien

1.) Hefeextrakt- Glucose- Medium (Schweyen, 1971)

Salze, Vitamine und Spurenelemente wie im
Minimalmedium nach Wickerham

Hefeextrakt	10 g
Glucose	20 g
H ₂ O bidest.	ad 1 l

2.) Hefeextrakt- Pepton- Glucose- Medium (Coen et al., 1970)

Hefeextrakt	10 g
Difco- Bacto- Pepton	10 g
Glucose	20 g
Sörensen- Puffer	
(0,05 M, pH 6,25)	ad 1 l

3.) Hefeextrakt- Pepton- Glycerin- Medium (N₃) (Coen et al., 1970)

wie 2.), jedoch 20 ml Glycerin

4.) Differentielles Hefeextrakt- Medium (YPD) (Coen et al., 1970)

wie 2.), jedoch 20 ml Glycerin und 1 g Glucose

II. Minimalmedien

1.) Synthetisches Minimalmedium nach Wickerham

siehe Abschnitt Minimalmedien für *Schizosaccharomyces pombe*

2.) Semisynthetisches Minimalmedium (W) (Clavilier et al., 1969)

Difco Yeast Nitrogen Base	6,7 g
Sörensen- Puffer	
(pH 6,25, 0,05 M)	ad 1 l

<u>Kohlenstoffquelle</u>	<u>Menge</u>	<u>Bezeichnung des Mediums</u>
Glucose	20 g/l	W0
Glycerin	20 ml/l	W3

3.) Supplementierter Minimalagar (Galzy und Slonimski, 1957)

Lösungen der angegebenen Aminosäuren und Basen werden nach Bedarf dem Wickerham- Minimalmedium oder dem semisynthetischen Minimalmedium vor dem Gießen der Platten steril zugegeben.

a) Charakterisierung von Auxotrophen

Alle aufgeführten Aminosäuren und Basen werden zugegeben mit Ausnahme der zu untersuchenden.

b) Diploiden- Selektionsmedium

Der Minimalagar wird supplementiert, so daß Diploide bei Komplementation wachsen können, die beiden verwendeten haploiden Stämme nicht.

Aminosäuren und Basen

<u>Aminosäure oder Base</u>	<u>Stammlösung</u>	<u>Zugabe pro l</u>	<u>Abkürzung</u>
Adenin	2 mg/ml	10 ml/l	A
Uracil	2 mg/ml	"	B
L- Arginin	1 mg/ml	"	C
L- Histidin	1 mg/ml	"	D
L- Isoleucin	6 mg/ml	"	E
L- Leucin	6 mg/ml	"	F
L- Lysin	1 mg/ml	"	G
L- Methionin	1 mg/ml	"	H
L- Tryptophan	2 mg/ml	"	I
L- Tyrosin	1 mg/ml	"	J
L- Valin	2 mg/ml	"	K
L- Canavanin	2 mg/ml	"	L

Die Medienbezeichnungen sind dann entsprechend der Nomenklatur nach Slonimski (Slonimski, persönliche Mitteilung) für synthetisches Medium mit Adenin WOA oder für solches mit Histidin und Valin WODK.

III. Sporulationsmedien

1.) Vorsporulationsmedium (PSP) (McClary et al., 1959)

Glucose	20 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g
KH_2PO_4	2 g
Hefeextrakt	5 g
H ₂ O bidest.	ad 1 l

2.) Sporulationsmedien

a) Sporulationsmedium 1 (SP 1) (McClary et al., 1959)

Glucose	1 g
Na- azetat	10 g
Hefeextrakt	2,5 g
H ₂ O bidest.	ad 1 l

Der pH des Mediums wird auf 6,9 eingestellt.

b) Sporulationsmedium 2 (SP 2) (Fowell, 1952)

Na- azetat	2,7 g
Sörensen- Puffer	
(0,02 M, pH 6,5)	ad 1 l

Der pH des Mediums wird auf 6,7 eingestellt.

c) Sporulationsmedium 3 (SP 3) (Slonimski, unveröffentlicht)

Na- azetat	2,7 g
Phosphat-Phthalat- Succinat- Puffer (PPS)	
(0,01 M, pH 4,5)	ad 1 l

Der pH des Mediums wird auf 5,2 eingestellt.

d) Azetat- Agar (Fowell, 1952)

Na -azetat	4,0 g
Agar	15,0 g
H ₂ O bidest.	ad 1 l

IV. Antibioticahaltige Medien

Grundmedium:

Hefeextrakt	10 g
Pepton	10 g
Glycerin	20 ml
Sörensen- Puffer	ad 1 l

mit 0,05 M Sörensenpuffer pH 6,25 ad 1 l = Medium N3

mit 0,05 M Sörensenpuffer pH 6,50 ad 1 l = Medium K3

Antibiotica und ihre Abkürzungen:

Chloramphenicol	C
Erythromycin	E
Oligomycin	O
Paromomycin	P

Zusammensetzung der Einfach-, Doppel- und Tripelmedien:

Medium	C	E	O	P	pH	Referenz
N3	-	-	-	-	6,25	Coen et al. (1970)
K3	-	-	-	-	6,5	Wolf et al. (1973)
N3C	4g/l	-	-	-	6,25	Coen et al. (1970)
N3E	-	5g/l	-	-	6,25	Coen et al. (1970)
N3O	-	-	3mg/l	-	6,25	Avner et al. (1973)
K3P	-	-	-	2g/l	6,5	Wolf et al. (1973)
N3CE	4g/l	5g/l	-	-	6,25	Coen et al. (1970)
N3CO	4g/l	-	3mg/l	-	6,25	Avner et al. (1973)
K3CP	4g/l	-	-	2g/l	6,5	Wolf et al. (1973)
K3OP	-	-	3mg/l	2g/l	6,5	Wolf et al. (1973)
K3COP	4g/l	-	3mg/l	2g/l	6,5	Wolf et al. (1973)

Anmerkungen:

Die Antibiotica Chloramphenicol und Erythromycin liegen als Base vor und werden in den angegebenen Mengen eingesetzt. Paromomycin wird als Sulfat verwendet, wobei 2 g Base 2,80 g Sulfat entsprechen. Die Antibiotica Chloramphenicol, Erythromycin und Paromomycin werden dem autoklavierten Medium bei etwa 50° C als Festsubstanz zugegeben. Oligomycin wird als Stammlösung in Methanol zubereitet und ebenfalls bei 50° C zugegeben. Um Bakterienwachstum zu verhindern, werden jedem Medium 125000 Einheiten pro Liter Natriumbenzylpenicillat zugefügt.

Doppelmedien mit Erythromycin und Paromomycin, sowie solche mit Erythromycin und Oligomycin können nicht verwendet werden.

Wenn nicht anders angegeben werden alle Medien mit 2,3 % Agar verfestigt.

C) Pufferlösungen

Mannitol- Tris- EDTA- Puffer (Balcavage und Mattoon, 1968)

Mannitol	0,25 M
Tris	0,02 M
EDTA	10^{-3} M

Der pH des Puffers wird auf 7,4 eingestellt.

Trispuffer, Phosphatpuffer nach Sørensen, Azetatpuffer
wurden nach den von Rauen (1964) und Mattenheimer (1966)
beschriebenen Rezepten zubereitet.

Phosphat- Phthalat- Succinat- Puffer (P. P. S.) (Sels und Jakob, 1967)
wurde zubereitet aus Na_2HPO_4 , K-Phthalat und Bernsteinsäure.
(0,01 M, pH 5,2)

Saccharoselösung für Gradienten

Tris	10^{-2} M
EDTA	10^{-3} M

In diesem Puffer wird Saccharose zu 70 % und 20 % (Gewicht pro Volumen) gelöst.

D) Feinchemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firma
Merck, Darmstadt, verwendet.

Cycloheximid: Serva GmbH, Heidelberg

Chloramphenicol: Roussel, Paris

Erythromycin: Roussel, Paris

Oligomycin: Serva GmbH, Heidelberg

Paromomycin: Geschenk der Firma Parke und Davis, Paris

Specilline (Natriumbenzylpenicillat): Industrie Biologique
Francaise S. A., Gennevilliers, Frankreich

Antimycin A: Serva GmbH, Heidelberg

Helicase: Boehringer, Mannheim

Suc d'Helix pomatia: Industrie Biologique Francaise S. A.,
Gennevilliers, Frankreich

NADH: Boehringer, Mannheim

Natriumsuccinat: Fluka AG, Buchs, Schweiz

Phenazinmethosulfat: Serva GmbH, Heidelberg

Coenzym Q₂: Geschenk der Firma Hoffmann la Roche

DL- p- Fluorphenylalanin: Serva GmbH, Heidelberg und Fluka AG,
Buchs, Schweiz

EDTA: Serva GmbH, Heidelberg

Cytochrom c: Boehringer, Mannheim

Magdalarot echt: Chroma- Gesellschaft Schmid u. Co., Stuttgart,
Untertürkheim

Ethidiumbromid: Serva GmbH, Heidelberg

1- Methyl- 3- nitro- 1- nitrosguanidin: Schuchardt, München

Methylmethansulfonat: Schuchardt, München

ICR 170: Geschenk von Dr. H. Creech, Institute of Cancer
Research, Philadelphia

METHODEN

A) Genetische Methoden

I. Genetische Methoden für *Schizosaccharomyces pombe*

1.) Aufbewahrung der Stämme

a) auf Schrägröhrchen

Alle dauernd verwendeten Stämme werden auf Schrägröhrchen mit 5 % Glucose und 2 % Hefeextrakt aufbewahrt. Die Röhrchen werden im Kühlraum gehalten und etwa alle 4 Monate überimpft.

- b) in Magermilch- Silicagel (Leupold, persönliche Mitteilung)
- 16 x 60 mm große Schraubdeckelröhrchen werden 25 mm hoch mit weißem feinkörnigem Silicagel (Kieselgel 0,2 - 0,5 mm, Merck) gefüllt und ohne Deckel mit Watte verschlossen im Trockenschrank 2 Stunden lang bei 180° C sterilisiert. Die Deckel werden separat in Petrischalen autoklaviert und bei ca. 100° C getrocknet. Nach Abschluß der Trockensterilisation läßt man die Silicagelröhrchen im Exsiccator abkühlen und verschließt sie dann fest mit den autoklavierten und getrockneten Schraubdeckeln. Die fertigen Röhrchen werden bei Raumtemperatur trocken und staubfrei aufbewahrt. Stämme, von denen Stammkulturen hergestellt werden sollen, werden 3 Tage bei 30° C in Schrägröhrchen auf Hefeextrakt- Glucose- Agar vorkultiviert. Das Zellmaterial jedes Schrägröhrchens wird in 1 ml steriler Magermilch suspendiert (50 g Bacto Skim Milk werden in 1 l H₂O bidest gelöst und 15 Minuten autoklaviert). Die Zellsuspensionen werden mit einer 1 ml- Pipette aufgenommen und in ein Röhrchen mit Silicagel übertragen, wobei vollständige Sättigung vermieden werden soll. Die Röhrchen werden eine Woche lang mit locker verschlossenem Schraubdeckel bei Raumtemperatur trocken und staubsicher aufbewahrt. Zur Kontrolle der Lebensfähigkeit des getrockneten Zellmaterials wird ein wenig Material in ein Röhrchen mit flüssigem Hefeextrakt- Glucose- Medium übertragen und dieses bei 30° C bebrütet. Dann werden die Silicagelröhrchen fest verschraubt, mit Parafilm verschlossen und im Kühlraum aufbewahrt.

2.) Mutagenese

- a) durch Bestrahlung mit ultravioletttem Licht (Wolf et al., 1971)
Eine aerob gewachsene, stationäre Kultur wird abzentrifugiert, zweimal mit Tris- Puffer (0,2 M, pH 7,0) gewaschen und mit einem Titer von $2 \cdot 10^7$ Zellen/ ml (in einigen Versuchen 10^8 Zellen/ ml) resuspendiert. In einer Glaspetrischale werden 10 ml Zellsuspension unter ständigen Vibrieren mit einer UV- Lampe (Sterisol F 1140 G 7, Original Hanau, NN 15/44 VK) im Abstand von 40 cm bestrahlt. Durch Abheben und Aufsetzen des Glasdeckels wird die Bestrahlung begonnen und beendet. Alle danach erfolgenden Schritte werden unter Gelblicht ausgeführt, obwohl Schizosaccharomyces pombe keine Photoreaktivierung zu besitzen scheint. (Harm und Haefner, 1968)
- b) durch 1- Methyl- 3- nitro- 1- nitrosoguanidin (NG)
(Wolf et al., 1971)

Eine aerob gewachsene, stationäre Kultur wird abzentrifugiert, zweimal in Azetatpuffer (0,2 M, pH 5) gewaschen und in Azetatpuffer resuspendiert. Der Titer wird auf $2 \cdot 10^8$ Zellen/ ml eingestellt. NG wird in einem Mörser pulverisiert und kurz vor Experimentbeginn in 5 ml Azetatpuffer gelöst (4 mg NG/ml Puffer). 2 ml der Zellsuspension werden in ein Reagenzglas gegeben und zur Temperaturanpassung 5 Minuten im Ultrathermostaten bei 30°C inkubiert. Zur Zeit Null werden 2 ml NG- Lösung zugegeben; die mutagene Behandlung wird durch Verdünnen in Vollmedium abgestoppt.

- c) durch salpetrige Säure (abgewandelt nach Gutz, 1963)
Eine Kultur wird während 28 Stunden unter Schütteln bei 30°C in 10 ml Hefecxtrakt- Glucose- Medium bebrütet und in physiologischer Kochsalzlösung zweimal gewaschen. Die Zellen werden dann in 10 ml Kochsalzlösung resuspendiert und während 6 Stunden weiter unter Schütteln bei 30°C bebrütet. Nach einmaligem Waschen in Kochsalzlösung werden die Zellen mit einem Titer von $2,5 \cdot 10^8$ Zellen/ ml in Kochsalzlösung resuspendiert. 1 ml der unverdünnten Kultur wird in einem Reagenzglas mit 8 ml Azetatpuffer (0,2 M, pH 4,0) von 30°C vermischt und während 10 Minuten bei 30°C im Wasserbad inkubiert.

Danach wird 1 ml NaNO_2 -Lösung (0,3 m, frisch zubereitet) zugegeben und weiter bei 30°C inkubiert. Nach 7 Minuten wird entnommen und die mutagene Behandlung durch Einpipettieren in Phosphatpuffer (0,2 M, pH 7,2) unterbrochen.

- d) durch 2-Methoxy-6-chloro-9-(3-[äthyl-2-chloräthyl] amino-propylamino) acridin- dihydrochlorid (ICR 170) (verändert nach Munz und Leupold, 1970)

Exponentiell wachsende Zellen (Titer etwa 10^7 Zellen/ml) werden abzentrifugiert, zweimal in Minimalmedium nach Olson und Johnson gewaschen und in 5 ml desselben Mediums zu einer Zelldichte von etwa 10^7 Zellen/ml resuspendiert. Danach wird 0,1 ml einer frisch bereiteten Lösung von ICR 170 (Peck et al., 1961; Preston et al., 1964) in Wasser dazugegeben, so daß die Endkonzentration des Mutagens etwa $5 \mu\text{g/ml}$ Inkubationsgemisch beträgt. Das Gemisch wird 3 Stunden bei 30°C geschüttelt. Die mutagene Behandlung wird durch Abzentrifugieren und zweimaliges Waschen in Hefeextrakt- Glucose- Medium beendet. Alle Versuche mit ICR 170 müssen im Dunkeln oder in gedämpftem Rotlicht ausgeführt werden.

- e) Mutagenese auf Platten (abgewandelt nach Fink und Lowenstein, 1969)

0,1 ml einer stationären Schüttelkultur werden auf Hefeextrakt- Glucose- Medium ausplattiert und der nach 2 Tagen Bebrütung bei 30°C entstandene Rasen auf eine frische Hefeextrakt- Glucose- Mediumplatte gestempelt. In der Mitte der Platte wird das Mutagen (NG, MMS, ICR 170, Diäthylsulfat) entweder als Festsubstanz oder als Lösung (konzentriert oder verschieden verdünnt) aufgebracht. Die Platten werden anschließend 3 Tage bei 30°C bebrütet (Platten mit ICR 170 werden dunkel gestellt). Die Platten werden entweder direkt auf Hefeextrakt- Glycerin- Vollmedium gestempelt oder die Zellen um den Hemmhof werden mit einer Öse abisoliert, in Wasser resuspendiert und in hoher Dichte ($10^4 - 10^5$ / Platte) auf Platten mit geeignetem selektiven Medium plattiert (siehe folgende Abschnitte).

f) durch ^{32}P - Zerfall

(Induktion der Mutantengruppe RDTTC bzw. RDCoCl_2 = pet 445 - pet 492. Diese Mutanten wurden von Herrn Dr. W. Bandlow auf folgende Weise erhalten.)

Eine Kultur (972h^-) wird in Gegenwart von 100 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid mit 10 % Glucose (Animpftiter $5 \cdot 10^4$, Endtiter $1,7 \cdot 10^7$, Mutantenbezeichnung I) bis in die stationäre Phase gezogen.

Eine zweite Kultur wird mit dem gleichen Titer beimpft und in einem Medium mit 0,2 % Glucose, 3 % Glycerin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid ebenfalls in die stationäre Phase gezogen.

(Endtiter $1,3 \cdot 10^7$, Mutantenbezeichnung II). Die Kulturen werden abzentrifugiert, gewaschen und in ethidiumbromidfreiem Medium aufgenommen. (I in 5 % Glycerin, II in 0,1 % Glucose + 1,5 % Glycerin). Die Kulturen werden 60 Minuten lang bei 30°C belüftet, 30 Minuten mit Cycloheximid inkubiert und dann 3 Stunden mit je 0,4 $\text{mCi } ^{32}\text{P}$ in phosphatlimitiertem Wickerham- Inkubationsmedium mit 1/1000 der angegebenen Phosphatkonzentration inkubiert (Schweyen, 1971). Anschließend wird abzentrifugiert, zweimal gewaschen, beide Kulturen in Hefeextraktmedium mit 5 % Glucose aufgenommen und im Kühlraum aufbewahrt. Die Überlebensrate beträgt hier nach 10 Tagen bei Kultur I 6 %, bei Kultur II $5,4 \cdot 10^{-4}$ %. Nach 21 Tagen werden beide Kulturen abzentrifugiert, gewaschen, in Hefeextraktmedium mit 4 mg/ml Chloramphenicol und 5 % Glucose aufgenommen und 2 Tage zwischenbebrütet. (Endtiter I: $1,4 \cdot 10^8$, II: $1,8 \cdot 10^8$). Anschließend wird verdünnt und auf Selektivmedium plattiert.

3.) Segregation

a) Segregation auf Platten

Zur Segregation wird die mutagen behandelte Suspension geeignet verdünnt und etwa 50 Überlebende auf Platten mit Hefeextrakt- Glucose- Medium gebracht. Die Segregation erfolgt während der etwa 20 Generationen bis zur Ausbildung einer Kolonie.

b) Segregation in flüssigem Medium

Man beimpft ein Röhrchen mit Hefeextrakt- Glucose- Medium mit den mutagen behandelten Zellen und läßt die Kultur etwa 1 - 3 Zellgenerationen wachsen.

4.) Selektion atmungsdefekter Mutanten (RD- Mutanten)

a) durch Abstempeln auf Hefeextrakt- Glycerin- Vollmedium (Pittman et al., 1960)

Die unter 3 a) beschriebenen Kolonien auf Hefeextrakt- Glucose- Medium werden auf Hefeextrakt- Glycerin- Medium gestempelt und 10 Tage bei 30° C bebrütet. Kolonien, die auf Glycerin als nicht vergärbarem Substrat nicht oder nur sehr langsam zu wachsen vermögen, werden als atmungsdefekt (RD) oder atmungsdefekt leaky (RD leaky) abisoliert.

b) durch 2,3,5- Triphenyltetrazoliumchlorid- Weichagar (Ogur et al., 1954, 1956, 1957, 1959)

Die in Abschnitt 3 a) beschriebenen Hefeextrakt- Glucose- Platten mit etwa 50 Kolonien werden mit folgendem Weichagar bei 40° C überschichtet:

1,5 % Agar

0,067 M Phosphatpuffer nach Sörensen pH 7,0

0,1 % 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)

Atmende Zellen färben sich in wenigen Stunden rot, atmungsdefekte Zellen bleiben weiß oder färben sich schwach rosa.

c) durch Überschichten mit 4,4 - Diaminodiphenyl (Benzidin) (Sherman et al., 1968)

Platten mit etwa 50 Kolonien (aus mutagen behandelten Zellen) werden mit Haarspray besprüht, um ein Verschmieren der Kolonien zu vermeiden. Die Platten werden dann mit 15 ml Benzidin-

Reagens überlagert (1 g Benzidin- dihydrochlorid, 20 ml Eisessig, 30 ml H_2O bidest, 50 ml 95%iger Äthylalkohol) Nach etwa 20 Sekunden wird das Reagens abgekippt und die Kolonien mit einer 5%igen (Gewicht/Volumen) Lösung von H_2O_2 überschichtet. Die Lösung wird etwa nach 10 - 15 Sekunden abgekippt, sobald die Kolonien sich leicht blau färben. Atmungsdefekte Kolonien sind benzidinnegativ und bleiben daher weiß.

5.) Anreicherungsverfahren für atmungsdefekte Mutanten

a) durch Deoxyglucose (Colson et al., 1972)

Die Methode entspricht der für die Anreicherung auxotropher Mutanten beschriebenen Methode (R. Megnet, 1965).

Ein Medium aus 1 % Hefeextrakt, 2 % Glycerin und 0,1 % Glucose wird mit mutagen behandelten Zellen beimpft und etwa 20 Stunden bebrütet, bis die Glucose aufgebraucht ist. Danach wird $400 \mu g/ml$ 2-Deoxyglucose zugegeben und 4 Stunden weiter bebrütet. Nach 4 Stunden wird abzentrifugiert, zweimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und geeignete Verdünnungen auf Hefeextrakt- Glucose- Medium plattiert. Die Selektion der atmungsdefekten Mutanten erfolgt nun durch Abstempeln auf Hefeextrakt- Glycerin- Medium (Abschnitt 4a))

b) durch Mesoinositmangel

Die für die Anreicherung auxotropher Mutanten von Megnet (Megnet, 1964) entwickelte Methode wurde hier für die Anreicherung Atmungsdefekter modifiziert.

Auf den Boden von Petrischalen wird steriles Filterpapier gelegt und 30 ml inositolfreies Minimalmedium nach Leupold oder Edinburgh- Minimalmedium gegossen. Das Filterpapier dient dazu, ein Brechen des Agars zu verhindern, wenn Mesoinosit und Kohlenstoffquellen (oder andere Supplementierungen) zugegeben werden. Mutagen behandelte und zwischenbebrütete Zellen werden zweimal in Minimalmedium gewaschen und in einer Dichte von $10^5 - 10^7$ Zellen pro Platte auf Minimalagar ohne Inositol gegeben. Die Platten werden 10 Tage lang

bei 30° C bebrütet. Während dieser Zeit lysieren alle atungskompetenten Zellen, da nur sie auf Glycerin zu wachsen vermögen. Danach wird der Agar an einer Seite mit einem sterilen Spatel angehoben, 1 ml Mesoinositolösung (1 mg/ml) und 1 ml 50%ige Glucoselösung einpipettiert. Man läßt den Agar wieder in die Platte zurückgleiten und inkubiert weitere 4 - 5 Tage bei 30° C. Die nach dieser Zeit entstandenen Kolonien werden abisoliert und auf Atmungsdefizienz getestet.

c) durch Cobaltsulfat (Bachofen et al., 1972)

Die mutagen behandelten Zellen werden nach Zwischenbebrütung in geeigneter Dichte (10^4 - 10^7 Zellen/Platte) auf Hefeextrakt- Glucose- Medium mit 1,5 mM oder 2 mM CoSO_4 plattiert. Die nach 3 - 4 Tagen Bebrütung bei 30° C entstandenen großen Kolonien werden abisoliert und auf ihre Atmungsdefizienz getestet.

d) durch TTC- haltiges Medium (Wolf et al., 1971, Bachofen et al., 1972)

Mutagen behandelte Zellen werden nach Zwischenbebrütung auf Hefeextrakt- Glucose- Medium mit 25 - 30 mg/ml TTC ausplattiert (10^4 - 10^7 Zellen /Platte); TTC wird dem Agar bei etwa 50° C steril zugegeben. Da TTC lichtempfindlich ist, müssen die Platten immer dunkel gehalten werden. Die nach 4 - 10 Tagen entstandenen großen weißen oder blaßrosa Kolonien werden abisoliert und auf ihre Atmungsdefizienz getestet.

e.) Reinigung und Reisolierung atmungsdefekter Mutanten

Die durch einen der vorher beschriebenen Tests vorläufig als atmungsdefekt charakterisierten Kolonien werden abisoliert und auf einer Hefeextrakt- Glucose- Platte im Sektorenausstrich ausgestrichen, um einige Einzelkolonien zu erhalten. Nach 4tägiger Bebrütung bei 30° C wird auf Hefeextrakt- Glycerin- Platten gestempelt und wiederum 8 - 10 Tage bebrütet. Kolonien, die sich nach diesem zweiten Test wieder als atmungsdefekt erweisen, werden abisoliert und entweder auf Schrägagar oder in Silicagel aufbewahrt.

In Abständen von einigen Monaten müssen die atmungsdefekten Mutanten reisoliert und getestet werden. Dies geschieht mit den hier beschriebenen Tests.

Anzucht: Eine Öse voll Material von einem Schrägröhrchen oder etwas Material aus einem Silicagelröhrchen wird in 5 ml Hefeextrakt- Glucose- Medium in ein Reagenzglas gegeben und 2 Tage bei 30° C unter Schütteln bebrütet. Von der stationären Kultur werden etwa 50 Zellen auf eine Hefeextrakt- Glucose- Platte gebracht und 3 Tage bei 30° C bebrütet.

Prüfung der Auxotrophie: Zur Prüfung der Wachstumsfakturbedürfnisse werden die Kolonien auf Minimalmedium bzw. Minimalmedium mit Supplementierung abgestempelt.

Prüfung der Atmungsdefizienz: Sie erfolgt durch Abstempeln auf Hefeextrakt- Glycerin- Medium. Andere nichtvergärbare Substrate sind für Schizosaccharomyces pombe nicht geeignet. (Bostock, 1968)

Prüfung auf Homothallie oder Heterothallie: Stämme des heterothallischen Paarungstyps h^+ mutieren im Gegensatz zu denen des Paarungstyps h^- leicht zum homothallischen Paarungstyp h^{90} (Leupold, 1950; Leupold, 1958). Zellen, die durch Mutation den homothallischen Paarungstyp besitzen, können miteinander kopulieren und Asci bilden, die sich schnell und leicht nachweisen lassen. Schizosaccharomyces pombe speichert in den Ascosporen eine stärkeartige Verbindung, welche mit Jod eine Reaktion ergibt. Die Joddämpfe werden durch Erhitzen kristallisierten Jodes in einem Becherglas erzeugt. Wird die Bedampfung auf wenige Sekunden beschränkt, so bleiben innerhalb der Kolonie genügend Zellen am Leben, um eine Überimpfung auf frische Nährböden zu ermöglichen. Die Mutterplatte wird auf eine Schale mit Malzextraktmedium übergestempelt, welche 3 - 5 Tage bei 25° C bebrütet wird. Wird die Platte einige Sekunden mit Joddämpfen behandelt, so erkennt man zwei Reaktionstypen: die heterothallischen Kolonien ergeben anfangs eine rotbraune Färbung, welche bald nach gelb abklingt. Die rotbraune Färbung läßt auf die Anwesenheit von Glycogen schließen. Die homothallischen Kolonien reagieren auf die Jodbedampfung anfänglich mit einer

schwarzbraunen Färbung, die nach einer Weile in ein bräunliches Violett übergeht und welche auf die Anwesenheit einer amylose-artigen Verbindung hindeutet (Leupold, 1955). Da die Färbung mit der Zeit verblaßt, müssen homothallische Kolonien sofort markiert werden.

Prüfung auf Haploidie und Diploidie:

durch Zellgröße: Zellmaterial der zu untersuchenden Kolonie wird zusammen mit einem haploiden und einem diploiden Stamm in 3 Sektoren auf eine Hefeextrakt- Glucose- Platte ausgestrichen und 3 Tage lang bei 30° C bebrütet. Die haploide oder diploide Konstitution der zu untersuchenden Kolonie wird durch Größenvergleich bestimmt, da diploide Zellen, die unter genau gleichen Bedingungen angezogen werden, deutlich größer sind als haploide (Leupold, 1950).

durch Vitalfärbung: Die zu untersuchenden Kolonien werden auf Hefeextrakt- Glucose- Medium abgestempelt, das 20 mg/l Magdalarot enthält. Der Farbstoff wird in wenig sterilem Wasser gelöst und dem etwa 50° C warmen Medium zugegeben. Die Platten werden 3 Tage bei 30° C bebrütet. Verglichen mit haploiden Kolonien enthalten diploide und aneuploide Kolonien mehr tote Zellen und färben sich deshalb mit Magdalarot viel stärker an (Leupold, 1970). Die Unterscheidung zwischen haploid und diploid ist nicht immer zweifelsfrei, da manche Mutanten bereits im haploiden Zustand größere Lethalität aufweisen (Schüpbach, 1971). Eine Kombination beider Methoden ist daher nötig.

Prüfung auf die heterothallischen Paarungstypen h^- und h^+ :

Die Mutterplatte wird auf zwei Platten mit Malzextrakt- Medium abgestempelt, auf die vorher ein Rasen der Testerstämme 972 h^- bzw. 975 h^+ plattiert wurde. Die Platten werden 5 Tage bei 25 ° C bebrütet und danach die Kolonien auf ihre Jodreaktion untersucht. Positive Jodreaktion erfolgt immer bei der Kombination mit dem entgegengesetzten Paarungstyp.

7.) Freisporanalyse im Rückkreuzungsverfahren

a) nach spontanem Zerfall der Asci (Leupold, 1957; Leupold, 1970)

Je 0,1 ml einer stationären Vorkultur beider Kreuzungspart-

ner (atmungsdefekte Mutante und atmungskompetenter Wildtyp im entgegengesetzten Paarungstyp) werden auf der Oberfläche eines Schrägröhrchens mit Malzextrakt- Medium (supplementiert für alle Auxotrophien beider Kreuzungspartner) verteilt und der Kreuzungsansatz 7 Tage bei 25° C bebrütet. In dieser Zeit sind alle Asci spontan zerfallen. Das Zellmaterial wird in 3,5 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und etwa 5 Minuten im Wasserbad bei 18° C inkubiert. Nach Zugabe von 1,5 ml absolutem Äthylalkohol (die alkoholische Lösung ist dann etwa 30 %ig) wird das Gemisch 30 Minuten weiter-inkubiert. Dabei werden die vegetativen Zellen abgetötet, die alkoholresistenten Sporen überleben.

Für die Weiterverarbeitung des Sporenmaterials können zwei Wege beschritten werden.

Entweder: man verdünnt die Suspension sofort und plattiert auf Hefeextrakt- Glucose- Medium. Dabei hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die Platten über Nacht bei Zimmertemperatur und erst dann bei 30° C zu inkubieren. Nach 5 Tagen wird auf Hefeextrakt- Glycerin- Medium abgestempelt.

oder: die alkoholische Suspension wird stark mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, kurz bei 4° C abzentrifugiert und in Kochsalzlösung aufgenommen. Dadurch wird der Alkohol weitgehend entfernt und die Sporensuspension kann längere Zeit in Eis aufbewahrt werden. Die Plattierung erfolgt wie oben beschrieben.

- b) nach Aufdauen der Asci mit Schneckenenzym (Leupold, 1970) Die Kreuzung verbleibt nur 3 Tage auf Malzagar. Das Material wird in 5 ml Kochsalzlösung aufgenommen und 6 Stunden bei 30° C mit Schneckenenzym ("Suc d'Helix pomatia", Industrie Biologique Francaise S.A., Gennevilliers, Frankreich; 1 : 1000 verdünnt) inkubiert. Die Alkoholabtötung, Verdünnung und Plattierung erfolgt wie oben beschrieben.

8.) Tetradenanalyse im Rückkreuzungsverfahren (Leupold, 1955)

Etwas Zellmaterial einer genau 3 Tage alten Kreuzung (atmungsdefekte Mutante x Wildtyp) wird in 1 ml Kochsalzlösung suspendiert und eine Öse voll auf einer trockenen Hefeextrakt-Glucose-Platte in Form eines Striches ausgezogen. Die Platte wird dann 14 Stunden bei 25° C inkubiert, wobei der größte Teil der Asci zerfällt. Mit Hilfe eines Mikromanipulators werden die 4 Sporen der Asci im Abstand von je 0,5 cm vom Impfstrich abgelegt und die Platte 3 Tage bei 30° C bebrütet. Die Platte kann entweder direkt auf Selektionsmedium gestempelt werden oder die aus den 4 Sporen entstandenen Kolonien können auf einer anderen Platte ausgestrichen werden.

9.) Qualitative Kreuzungsanalyse atmungsdefekter Mutanten untereinander (Leupold, 1955)

Je 4 - 6 Mutanten werden in ihrer ursprünglichen Paarungstypkonfiguration (z. B. h^-) in parallelen Strichen auf einer Hefeextrakt-Glucose-Platte ausgestrichen. In einer zweiten Platte werden 4 - 6 Nachkommen dieser Mutantenstämme ausgestrichen, welche aus Rückkreuzungen mit dem Wildtyp entstanden sind und welche die Atmungsdefizienz der Mutante mit dem Paarungstyp h^+ des Elternwildtyps rekombiniert haben. Nach 2 - 3 Tagen Bebrütung bei 30° C wird von den beiden Platten ein Samtabdruck genommen und in eine Platte mit Malzextraktmedium übertragen. Hierbei werden die beiden Samtkopien kreuzweise übereinander gestempelt. Die so beimpfte Platte wird ihrerseits bei 25° C bebrütet. Nach 5 Tagen haben sich an sämtlichen Überkreuzungsstellen der Ausstriche zahlreiche Asci gebildet, da an diesen Stellen in jedem Falle Zellen entgegengesetzten Paarungstyps kombiniert worden sind und kopuliert haben. Dies läßt sich leicht an der positiven Jodreaktion der Überkreuzungsstellen erkennen. Es entspricht also jede Überkreuzungsstelle einer eigentlichen Kreuzung. Von einer solchen Platte wird ein Abdruck genommen und auf Hefeextrakt-Glycerin-Medium übertragen. Nach 6 - 8 Tagen Bebrütung bei 30° C ergibt sich folgendes Bild. In den Verbindungsstücken zwischen den einzelnen Überkreuzungsstellen sowie in den Überkreuzungsstellen der einen Diagonalen, das heißt in den Inzuchtkreuzungen zwischen identischen Mutanten

verschiedenen Paarungstyps, ist erwartungsgemäß kein Wachstum eingetreten. In allen anderen Fällen zeigt sich unterschiedliches Wachstum oder ebenfalls kein Wachstum. Das ganze Verfahren ist noch einmal schematisch in Figur 73 dargestellt.

10.) Qualitativer Komplementierungstest zweier atmungsdefekter Mutanten (Leupold, 1970)

Eine kleine Öse voll Zellmaterial einer Kreuzung zweier atmungsdefekter Mutanten wird in 1 ml Kochsalzlösung suspendiert und eine große Öse voll Zellmaterial in einem Sektor einer Hefeextrakt- Glycerin- Platte ausgestrichen. Die Bebrütung erfolgt 8 - 10 Tage bei 30° C. In den haploiden Elternstämmen sind regelmäßig seltene diploide Zellen enthalten, welche triploide Zygoten bilden (Leupold, 1956). Dies geschieht mit der Häufigkeit von einer unter 10^3 Ascosporen. Es entstehen hierbei diploide und aneuploide Nachkommenssporen von teilweise heterozygoter Konstitution für die beiden parentalen Allele der Atmungsdefizienz. In den Fällen, in denen die zwei Allele zur interallelen Komplementation fähig sind, keimen die heterozygoten Ascosporen zu atmungskompetenten Kolonien aus. Diese können von den haploiden Rekombinantenkolonien durch ihre unterschiedliche Größe unterschieden werden. Die Größe von haploiden Rekombinanten wird nur im Falle starker Komplementation erreicht. Eine Unterscheidung im Falle starker Komplementation ist möglich durch Abstempeln auf Hefeextrakt- Glucose- Medium mit Magdalarot, auf dem sich diploide Kolonien tiefer anfärben als haploide. Die Anzahl der in einer Öse vorhandenen Sporen zur Bestimmung der Komplementation beträgt durchschnittlich 10^5 .

11.) Qualitativer Rekombinationstest mit zwei atmungsdefekten Mutanten (Leupold, 1955)

Parallel zum qualitativen Komplementationstest wird eine kleine Öse voll Zellmaterial der 7 Tage alten Malzagar- Mischkultur direkt in einem Sektor einer Glycerinplatte aufgetragen und mit einer großen Öse voll Kochsalzlösung ausgestrichen. Eine Öse voll enthält im Durchschnitt etwa 10^7 Sporen. Die ungefähre Häufigkeit atmungskompetenter Rekombinanten wird abgeschätzt.

12.) Quantitativer Rekombinationstest zwischen zwei atmungsdefekten Mutanten (Leupold, 1955)

Für zwei nicht oder schwach komplementierende Mutanten wird das Kreuzungsgemisch der Alkoholabtötung unterworfen, 10^5 , 10^6 und 10^7 Sporen auf Hefeextrakt- Glycerin- Medium direkt plattiert und 8 - 10 Tage bei 30°C bebrütet. Parallel dazu wird nach geeigneter Verdünnung zur Titerbestimmung auf Hefeextrakt- Glucose-Medium plattiert. Die Anzahl der atmungskompetenten Rekombinanten wird bestimmt.

13.) Selektion stabiler Diploider aus zwei atmungsdefekten Mutanten (Leupold, 1970; da Cunha, 1970)

Obwohl Schizosaccharomyces pombe ein haploider Organismus ist, können doch stabile diploide Stämme hergestellt werden. Auf Schrägröhrchen mit Hefeextrakt- Glucose- Medium werden die zwei Mutanten, von denen man Diploide herstellen will, angeimpft und 3 Tage bei 30°C bebrütet. Die Mutanten müssen 2 verschiedene, einander komplementierende Auxotrophien (möglichst Heteroallele) und verschiedene heterothallische Paarungstypen besitzen. Das Zellmaterial der beiden Mutantenkulturen wird in je 5 ml Kochsalzlösung suspendiert. Gleiche Volumina beider Zellsuspensionen werden gemischt, 0,1 ml der Mischsuspensionen in 3 Röhrchen mit vertikal erstarrtem Sporulationsagar gegeben und über Nacht 15 Stunden bei 25°C bebrütet. Danach wird das Zellmaterial der Mischkulturen auf Sporulationsagar in je 1 ml Kochsalzlösung suspendiert, je 0,1 ml auf Minimalagar ausplattiert und bei 30°C 4 - 5 Tage bebrütet. Dann untersucht man die in den Minimalagarplatten gebildeten prototrophen Kolonien nach schwacher Jodbedampfung auf die Anwesenheit jodpositiver, das heißt sporulierender diploider Kolonien. Die Diplophase ist hier das Ergebnis einer selten vegetativen Entwicklung diploider Zygoten, die Prototrophie das Ergebnis intergener (oder intragener) Komplementierung. Die jodnegativen, nichtsporulierenden Kolonien sind haploide prototrophe Rekombinanten; diese Kolonien sind meist größer. Zur Sicherheit vergleicht man mikroskopisch die Zellgröße von haploiden und diploiden Kolonien. Das Zellmaterial von etwa 5 diploiden Kolonien wird in je 1 ml Kochsalzlösung suspendiert. Von den er-

haltenen Zellsuspensionen ausgehend wird je eine Öse als Linie an der Seite einer Platte ausgestrichen (Die Hefeextrakt-Glucose-Platten sollten in Rücksicht auf die Mikromanipulierteknik auf völlig ebener Unterlage gegossen und 3 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt werden). Mit dem Mikromanipulator werden etwa 10 diploide Zellen pro Platte ca. 2 - 3 cm vom ausgestrichenen Zellmaterial weggezogen und auf dem Agar ausgelegt. Der Ort der Ablegung der so isolierten diploiden Zellen wird durch Einstich mit der Mikromanipulatornadel in den Agar markiert. Die Platten werden 1 Tag bei 30° C bebrütet. Einige der sich entwickelnden Mikrokolonien - die Sporulation ist zu dieser Zeit noch nicht eingetreten - werden mit Hilfe eines Spatels aus dem Agar ausgeschnitten und das Zellmaterial samt dem ausgeschnittenen Agarblöckchen in je ein Reagenzglas mit Hefeextrakt-Glucose-Agar übertragen. Nach ca. 2 Tagen Bebrütung bei 30° C, nach dem die Zellkonzentration ca. 10^7 - $5 \cdot 10^7$ Zellen/ml erreicht hat, das heißt vor Eintritt der Sporulation, wird eine der Kulturen auf ca. $2 \cdot 10^3$ Zellen/ml verdünnt und je 0,1 ml der verdünnten Suspension in 10 Schalen auf Malzextraktagar ausplattiert. Zugleich werden Verdünnungsausstriche der beiden Kreuzungspartner auf Malzextrakt-Agar angesetzt. Die Malzagarplatten werden 4 - 5 Tage bei 30° C bebrütet. Die auf den Malzagarplatten gebildeten diploiden Kolonien werden dann nach schwacher Jodbedampfung auf die Anwesenheit jodnegativer, das heißt nichtsporulierender diploider Kolonien durchgesehen. Diese nichtsporulierenden diploiden Kolonien sind das Ergebnis von mitotischem crossing-over zwischen dem Paarungstyplocus und dem zugehörigen Centromer oder das Ergebnis von mitotischem non-disjunction. Diese Diploiden sind homozygot für das eine oder andere Paarungstypallel. Die Zellgröße der Diploiden wird mit derjenigen gleichaltriger haploider Malzextraktgarkulturen verglichen. Als zusätzliche Kontrolle dient eine Ausplattierung der beiden haploiden Kreuzungspartner und der Diploiden auf Hefeextrakt-Glucose-Medium mit Magdalarot. Mehrere der nicht sporulierenden Kolonien werden in Röhrchen mit Hefeextrakt-Glucose-Agar überimpft und gleichzeitig Vorkulturen der haploiden heterothallischen Testerstämme 972 h⁻ und 975 h⁺ angesetzt. Nach 3 Tagen werden Mischsuspensionen vom

Zellmaterial der isolierten diploiden Kulturen mit Zellmaterial der Testerstämme angesetzt und von jeder Mischsuspension ein Sektorenausstrich auf Malzextrakt- Agar hergestellt. Nach 4 - 5 Tagen Bebrütung bei 25° C wird durch Jodbedampfung die Paarungsreaktion der Mischkulturen auf Malzextrakt- Agar festgestellt. Diploide der Paarungstypkonfiguration h^-/h^- werden auf Schrägagar gegeben, die der Konfiguration h^+/h^+ wegen ihrer geringeren Stabilität verworfen.

14.) Haploidisierung durch p-Fluorphenylalanin (Gutz 1966; da Cunha, 1970)

0,1 ml einer stationären Kultur einer stabilen Diploiden homozygoter Paarungstypkonfiguration h^-/h^- wird in einem Schrägröhrchen mit Hefeextrakt- Glucose- Medium mit 0,12 % p-Fluorphenylalanin ausgestrichen (Konzentration von p-Fluorphenylalanin : J. Kohli, persönliche Mitteilung) und bei 30° C bebrütet. Danach werden die Zellen in Kochsalzlösung suspendiert, verdünnt und auf Hefeextrakt- Glucose- Medium plattiert. Nach 5 Tagen Bebrütung bei 30° C werden die Platten auf Hefeextrakt- Glycerin- Medium, Minimalmedium mit und ohne Supplementierung und Magdalarotmedium gestempelt. Kolonien, welche auxotroph sind, auf Glycerinmedium nicht wachsen und auf Magdalarot hellrot erscheinen, sind haploid.

15.) Test auf konditionelle Mutanten (Hawthorne und Friis, 1964; Munz und Leupold, 1970)

Atmungsdefekte Mutanten werden auf je 3 Plattensorten ausgestrichen, welche 30 g, 180 g und 360 g/l Glycerin + 0,1 % Glucose enthalten. Je eine Platte jeder Konzentration wird bei 25° C, 30° C und 35° C bebrütet. Hierbei wird auf Temperatursensibilität, osmotische Heißbarkeit und Kombination beider Phänomene getestet.

II. Genetische Methoden für *Saccharomyces cerevisiae*

1.) Aufbewahrung der Stämme

a) auf Schrägröhrchen

Die Stämme werden alle 4 - 6 Monate auf Schrägröhrchen überimpft. (Medium: 1 % Hefeextrakt, 1 % Pepton, 5 % Glucose, Phosphatpuffer nach Sörensen 0,05 M pH 6,25 ad 1 l)

b) in Silicagel

Material: Silica- Gel, Typ I, zur Chromatographie, 60 - 200 mesh. Katalog Nr. S7375, Sigma Chemical Co oder: Kieselgel Woelm, zur Chromatographie, 0,063 - 0,2 mm Korngröße, M. Woelm, Eschwege
Schraub Röhrchen 35 x 12 mm

Die Schraub Röhrchen werden etwa zur Hälfte mit Silicagel gefüllt und in einem Metallbehälter 3 Stunden bei 180° C trocknensterilisiert. Die Schraubkappen werden getrennt autoklaviert und getrocknet. Die abgekühlten Schraub Röhrchen werden verschlossen und sind fertig zum Gebrauch. 6 Hefestämme werden auf eine Hefeextrakt- Pepton- Glucose- Platte ausgestrichen und 3 Tage bei 30° C bebrütet. Ein Metallblock mit den fertigen Silicagel Röhrchen wird über Nacht in der Tiefkühltruhe bei - 20° C gekühlt und kurz vor Gebrauch in ein Eisbad gestellt. Die Zellen werden mit einem abgeflamten Spatel von der Platte abgekratzt und gut in Kieselgel vermischt. Die Schraubkappen werden fest angezogen und die Röhrchen mit Parafilm verschlossen. Die Röhrchen verbleiben einige Stunden im Eisbad und werden dann im Kühlraum aufbewahrt. Bei Bedarf kann man mehrere Male mit einem sterilen Spatel Material entnehmen und in ein Röhrchen mit Nährmedium übertragen. Die Haltbarkeit der Silicagelkulturen beträgt mindestens 5 Jahre.

c) unter Paraffin

Schrägröhrchen werden bis oben mit sterilem Paraffin aufgefüllt, wodurch ein Austrocknen des Agars verhindert wird.

d) tiefgefroren in Flüssigmedium

Die Zellen werden in folgendem Medium bei - 20° C gehalten: Hefeextrakt 1 %, Pepton 1 %, Glucose 2 %, Glycerin 25 %.

Bei Wiederverwendung wird schnell aufgetaut und ein Tropfen in Vollmedium gegeben. Die Haltbarkeit beträgt 1 - 2 Jahre.

c) durch Gefriertrocknung

Zellen werden gefriergetrocknet und in Ampullen eingeschmolzen. Die Haltbarkeit beträgt mindestens 5 Jahre.

2.) Mutagenese mit Ethidiumbromid (Dolotin et al., 1971)

a) Mutagenese unter nicht- wachsenden Bedingungen

Stoff	ml	Konz. der Stammlsg.	Endkonz.
Ethidiumbromid (filtersteril)	0,1	250 µg/ml	5 µg/ml
Cycloheximid (filtersteril)	0,1	500 µg/ml	10 µg/ml
Sörensenpuffer (autoklaviert)	0,5	0,5 M, pH 6,5	0,05 M
Ringerlösung (autoklaviert)	3,8		

Zu der Mischung werden in einem Erlenmeyerkolben, der mit Aluminiumfolie umwickelt ist (Ethidiumbromid ist lichtempfindlich) 0,5 ml einer Zellsuspension von 10^7 Zellen/ml gegeben. Die Zellkonzentration im Versuchsansatz beträgt also 10^6 /ml. Die Mischung wird 1 - 3 Stunden bei 30°C geschüttelt und Proben zu verschiedenen Zeiten entnommen, welche auf Hefeextrakt- Pepton- Glucose- Medium oder differentiellies Medium (YPD) plattiert werden.

b) Mutagenese unter wachsenden Bedingungen

Statt Ringerlösung wird Hefeextrakt- Pepton- Glucose- Medium verwendet. Man läßt die Zellen in die stationäre Phase wachsen, plattiert auf Hefeextrakt- Pepton- Glucose- Medium und stempelt nach 3 Tagen Bebrütung auf Hefeextrakt- Pepton- Glycerin- Medium.

3.) Anzucht der Stämme

Ausgehend von Zellmaterial von Schrägröhrchen, Silicagel oder anderen Konservierungsarten wird ein Reagenzglas mit Hefeextrakt- Pepton- Glucose- Medium beimpft und 1 - 2 Tage bei 30°C

geschüttelt. Von dieser Kultur wird ein Reagenzglas mit selektivem Medium (N3 oder K 3 mit den entsprechenden Antibiotica) beimpft und 3 Tage bei 30° C bebrütet. Diese selektiven Vorkulturen dienen für die späteren Kreuzungen.

4.) Testen der Stämme

- a) auf Auxotrophie durch Auftropfen stark verdünnter Suspensionen (10^6 Zellen/ml) auf entsprechend supplementiertes Minimalmedium (nach Wickerham oder semisynthetisch)
- b) auf den ρ^+ -Zustand durch Auftropfen dieser Suspensionen auf N3 - Medium.
- c) auf Antibioticaresistenz durch Auftropfen auf die Medien N 3 und K 3 mit den entsprechenden Antibiotica.
- d) auf den Kernpaarungstyp durch Auftropfen auf einen Rasen mit einem Paarungstyp- Testerstamm (siehe Stämme) (die Auxotrophien beider Stämme müssen einander komplementieren) und Abstempeln auf Minimalmedium.
- e) Kontaminationskontrollen (Schweyen, 1971)
Alle Kulturen für größere Versuchsansätze werden neben der mikroskopischen Kontrolle auch noch durch Ausplattieren auf Medium mit 10 µg/ml Cycloheximid auf Bakterien kontrolliert. Bakterien, welche in dem verwendeten Medium zu wachsen vermögen, bilden auf der Platte innerhalb von 2 Tagen Kolonien.

5.) Standardkreuzung und mitotische Segregation (Coen et al., 1970; Bolotin et al., 1971)

Zwei haploide Stämme entgegengesetzten Paarungstyps und komplementierender Auxotrophien werden in selektivem Medium bis in die stationäre Phase gezogen. Je 0,1 ml der beiden Suspensionen werden auf Minimalmedium plattiert und 3 Tage bei 30° C bebrütet. Viele (mehr als 10^3) Kopulationen zwischen haploiden Zellen finden in dieser Zeit statt und ein Rasen von Diploiden entwickelt sich, der etwa 20 Zellgenerationen beinhaltet. Während dieser 20 aufeinander folgenden mitotischen Teilungen segregiert die Mitochondrienpopulation (mitotische Segregation).

6.) Quantitative Analyse der diploiden Population durch

Replica- plating (Coen et al., 1970; Bolotin et al., 1971)

Die diploiden Kolonien aus der Standardkreuzung werden mit Kochsalzlösung von der Platte gewaschen, verdünnt und etwa 30 - 50 Zellen auf Minimalmedium plattiert. Wenn die Kolonien etwa 2 - 3 mm Durchmesser erreicht haben, werden sie auf die entsprechenden antibioticahaltigen Medien und auf Glycerin- Medium zur Bestimmung der spontan entstandenen rho⁻ Mutanten gestempelt. Nach 3 - 4 Tagen Bebrütung bei 30° C werden die Platten verglichen und Kolonien des gewünschten Genotyps abisoliert.

7.) Quantitative Analyse der diploiden Population durch

"Aliquot plating" (Coen et al., 1970; Bolotin et al., 1971)

Da bestimmte Konfigurationen mitochondrialer Mutationen in der diploiden Population sehr selten sind (Coen et al., 1970; Bolotin et al., 1971; Avner et al., 1972; Wolf et al., 1973), können sie nicht mehr durch die Stempeltechnik erfaßt werden. Bestimmte seltene Typen können dadurch isoliert werden, daß eine große Anzahl von Diploiden auf ein für diesen Typ von Diploiden selektives Medium plattiert wird.

8.) "Cross-replica" - Technik zur Reinigung und Bestimmung der Stabilität von petites (Bolotin et al., 1971)

Die erwähnten Antibiotica können in der Zelle nur angreifen, wenn der Energiebedarf über die Atmung gedeckt wird, das heißt nur bei Wachstum auf nichtvergärbarem Substrat wie Glycerin. Die petites, welche auf ihrem mitochondrialen Genom noch die Information für die Resistenz gegen ein bestimmtes Antibioticum (oder mehrere Antibiotica) tragen, können bezüglich ihrer Resistenz nicht genetisch getestet werden, da sie auf Glycerin nicht zu wachsen vermögen. Das Vorhandensein der Information zur Resistenz kann deshalb nur in einer Diploiden aus der zu untersuchenden petite und einem antibiotica- sensiblen Stamm getestet werden. Petites, bei denen ein größeres Stück des mitochondrialen Genoms erhalten ist, sind meist nicht stabil und verlieren im Laufe der Zeit spontan ihre mitochondriale DNS.

Ein petite- Klon eines bestimmten mitochondrialen Genotyps wird deshalb zur Reinigung auf Hefeextrakt- Pepton- Glucose-Medium in einer Dichte von etwa 50 - 100 Zellen pro Platte ausplattiert und die sich nach drei Tagen Bebrütung entwickelnden Kolonien auf einen frisch plattierten Rasen eines sensitiven Stammes entgegengesetzten Paarungstyps und komplementierender Auxotrophien auf Minimalmedium gestempelt. Nach 2 Tagen Bebrütung wird dann auf das entsprechende antibiotica-haltige Medium gestempelt und weitere 3 Tage bebrütet. Ein Teil der Kolonien vermag auf dem antibioticahaltigen Medium zu wachsen, wobei die genetische Information zur Resistenz nur vom rho- Partner stammen kann. Von der Mutterplatte wird nun eine haploide petite-Kolonie abisoliert, welche in der Kreuzung mit dem Testerstamm eine resistente Diploide ergab. Dieser petite-Stamm wird nun weiteren solchen Reinigungsschritten unterworfen, bis sich das mitochondriale Genom dieser Mutante möglichst stabilisiert hat.

9.) Sporulation von Diploiden (Fowell, 1969; Mortimer und Hawthorne, 1969)

Ausgehend von einer stationären Vorkultur einer Diploiden in selektivem Medium wird ein Erlenmeyerkolben (100 ml) mit 5 ml Vorsporulationsmedium beimpft. Diese Kultur wächst in 2 - 3 Tagen in die stationäre Phase. Ein Erlenmeyerkolben (100 ml) mit 5 ml Sporulationsmedium (meist SP 1) wird mit einem Tropfen aus der Vorsporulationskultur beimpft und 4 - 7 Tage bei 28° C geschüttelt. Nach 4 Tagen entwickeln sich die ersten Asci.

10.) Tetradenanalyse (Mortimer und Hawthorne, 1969)

2 - 3 Tropfen der Sporulationskultur werden mit 1 Spatelspitze Helicase (fest), etwas Cystein und 1 - 2 ml Wasser vermischt. (bei flüssigem Schneckenenzym etwa 5 Tropfen Enzym) und 45 Minuten bei 30° C inkubiert. Es werden Platten mit etwa 15 ml differentielltem Medium (YPD) gegossen, kleine Stücke ausgeschnitten und ein Strich der Suspension an einer Seite des Agarstücks ausgestrichen. Das Agarstück wird nun in einer Mikromanipulierkammer

hängend montiert. Mit Hilfe eines Mikromanipulators (De Fonbrune) werden die 4 Sporen einer Tetrade getrennt und auf dem Agarstück im Abstand von 3 - 4 mm ausgelegt. Das Agarstück wird auf eine YPD-Platte übertragen, 3 - 4 Tage bei 30^o C bebrütet und anschließend die 4 aus den Sporen entstandenen Kolonien abisoliert.

B) Biochemische Methoden

Die biochemischen Methoden sind für beide Organismen weitgehend die gleichen. Auf eventuelle Abweichungen wird jeweils hingewiesen.

1.) Präparation mitochondrialer Strukturen (Mattoon und Balcavage, 1968)

Zur Anzucht von Wildtypen und atemungsdefekten Mutanten beider Organismen wird eine Flüssigkeitskultur zu einem Titer von etwa 10^6 Zellen/ml angeimpft und bis in die stationäre Phase bei 30°C belüftet. Als Medium dient Hefeextraktmedium (für Saccharomyces cerevisiae mit Pepton) mit 3 % Glucose, 3 % Galactose oder 3 % Glycerin als Kohlenstoffquelle. Da für Untersuchungen an atemungsdefekten Mutanten nur Glucose als Kohlenstoffquelle in Frage kommt, muß vor der Präparation der Mitochondrien das völlige Verschwinden der Glucose in der Kultur mit Indikatorpapier (Glucotest, Boehringer, Mannheim) oder mit der Anthron-Methode (Yemm und Willis, 1954) getestet werden. Alle weiteren Operationen werden unter Eiskühlung vorgenommen. Die Kultur wird zweimal je 10 Minuten bei $1000 \times g$ abzentrifugiert und mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Das Pellet wird in MTE - Puffer (pH 7,4) aufgenommen und die dichte Zellsuspension mit dem gleichen Volumen an Glasperlen ($\varnothing$ 0,45 - 0,5 mm) in Knackflaschen (20 ml Hefesuspension und etwa 20 ccm Glasperlen) vermischt. Der mechanische Zellaufschluß erfolgt im Merkenschlager Homogenisator bei maximaler Schüttelgeschwindigkeit und Kühlung durch flüssiges Kohlendioxid. Die Zerstörung der Zellen wird für jede Präparation mikroskopisch kontrolliert. Sie beträgt bei Schizosaccharomyces pombe für 30 bis 40 Sekunden etwa 40 bis 60 %, bei Saccharomyces cerevisiae für 15 Sekunden etwa 30 bis 50 %, bei 40 Sekunden mehr als 80 %. Nach Zerschlagen der Zellen wird das Homogenat abdekantiert und die Glasperlen mit MTE - Puffer ausgewaschen. Die so gewonnene Suspension wird von restlichen Glasperlen, ganzen Zellen, Zellkernen und größeren Bruchstücken durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationen (10 Minuten bei $750 \times g$ und 15 Minuten bei 1100

x g) befreit. Die Sedimente werden verworfen und der Überstand 30 Minuten bei 7700 x g abzentrifugiert. Das Pellet enthält Mito-mitochondrien, darüber hinaus noch Verunreinigungen wie Mikrosomen, Zellmembranstrukturen, Golgivesikeln, Lysosomen usw. Die so gewonnene Mitochondriensuspension wird für Enzymtests und teilweise für Spektren benutzt.

2.) Reinigung der Mitochondrien durch Gradientenzentrifugation (Schweyen, 1971)

Das Sediment der 7700 x g Zentrifugation wird in 4 ml MTE- Puffer (pH 7,4) aufgenommen und in einem Potter- Elvehjem- Homogenisator homogenisiert. Diese Mitochondriensuspension wird durch Gradientenzentrifugation gereinigt. Lineare Gradienten (35 ml) werden mit Hilfe eines Mischers hergestellt, der auf dem Prinzip der kommunizierenden Röhren aufgebaut ist (Knolle und Lüdke, 1966). Die homogenisierte Suspension wird auf den Zuckergradienten geschichtet und 90 Minuten in einem SW - 27 - Rotor einer präparativen Ultrazentrifuge (L 2 - 50 B, Beckman Instruments) bei 27.000 Umdrehungen/Minute (mittlere Zentrifugalkraft 95.000 x g) zentrifugiert. Die Gradienten werden vorgekühlt auf + 2° C, die Rotortemperatur beträgt während des Laufes + 10° C. Die Fraktionierung der Gradienten erfolgt durch Anstechen des Bechers am unteren Ende mit einer Injektionsnadel und Absaugen durch eine Durchflußkuvette im Photometer (DE, Beckman Instruments). Dabei wird die Extinktion bei 420 nm aufgezeichnet und Fraktionen zu 20 Tropfen (etwa 1,5 ml) gesammelt (Ultrac- Rac- Fraktionssammler, Firma LKB). Die Fraktionen werden bei -20° C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Diese Mitochondrienpräparation wird teilweise für Cytochromspektren verwendet.

3.) Präparation submitochondrialer Partikel (verändert nach Schatz, 1967)

Das vorgereinigte Mitochondriensediment wird in 0,1 M Phosphatpuffer aufgenommen und nachdem es homogenisiert ist, mit einem Branson Sonifier Modell B 12 (Normalspitze) ultrabeschallt. Die Beschallung dauert insgesamt 60 Sekunden und wird in Abständen von 90 Sekunden bei Eiskühlung 10 Sekunden lang mit einer Stärke

von 80 Watt (Stufe 3,5) durchgeführt. Anschließend wird die beschallte Partikelsuspension 60 Minuten bei 40.000 Umdrehungen/Minute (Rotor 50 Ti, Spinco Modell L) zentrifugiert. Der rötlich- gelbe Überstand wird verworfen und das Sediment wieder in 0,1 M Phosphatpuffer aufgenommen und homogenisiert. Das Homogenat wird nochmals in gleicher Weise beschallt und 30 Minuten bei 50.000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Zum Schluß wird das Pellet, bestehend aus groben submitochondrialen Partikeln, in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2) aufgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

4.) Bestimmung der Enzymaktivitäten

a) NADH - CoQ (Menadion) - Oxidoreductase (modifiziert nach Sanadi et al., 1967)

Reaktionsmechanismus:



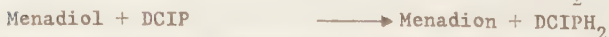
Das Enzym wird spektrophotometrisch durch die Abnahme der Absorption bei 340 nm während der Oxidation von $\text{NADH} + \text{H}^{+}$ durch Menadion gemessen. Da Menadion im Gegensatz zu CoQ 0 im Test Linearität zwischen eingesetzter Proteinmenge und Enzymaktivität ergibt und zusätzlich keine störende Trübung während des Testverlaufs zeigt, ist es für die Untersuchungen besser geeignet als CoQ 6.

Reaktionsgemisch:

Tris- Puffer (0,5 M, pH 8,0)	0,2 ml
Menadion (10mM in Methanol)	0,05 ml
KCN (30 mM)	0,05 ml
$\text{NADH} + \text{H}^{+}$ (10 mM)	0,1 ml
H_2O bidest	ad 2 ml

b) Succinat - CoQ (Menadion) - Oxidoreductase (modifiziert nach Ziegler und Rieske, 1967)

Reaktionsmechanismus:



Gemessen wird der Absorptionsabfall während der Oxidation von Succinat durch 2,6 - Dichlorphenol - indophenol- Natrium

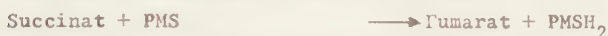
(Dihydrat) (blau) zu DCIPH₂ (farblos) bei 600 nm

Reaktionsgemisch:

Succinat (1M, pH 7,0)	0,05 ml
Phosphatpuffer (1M, pH 7,0)	0,2 ml
EDTA (1mM)	0,02 ml
Triton (1 %)	0,01 ml
DCIP (0,1 %)	0,03 ml
Menadien (10mM in Methanol)	0,05 ml
H ₂ O bidest	ad 2 ml

c) Succinat- Cytochrom c- Oxidoreductase (modifiziert nach Tisdale, 1967)

Reaktionsmechanismus:



Die Succinatdehydrogenase kann die Oxidation von Succinat auch mit einer Anzahl künstlicher Elektronenakzeptoren katalysieren. Phenazin- Methosulphat (PMS) übernimmt die Elektronen direkt von der Dehydrogenase und überträgt sie auf das Cytochrom c. Gemessen wird die Extinktionszunahme während der Reduktion des Cytochrom c mit und ohne PMS bei 550 nm.

Reaktionsgemisch:

Succinat (1M, pH 7,0)	0,1 ml
Phosphatpuffer	
(0,1M, pH 7,2, 10mM EDTA)	1,0 ml
Ferricytochrom c (52 mg/ml)	0,05 ml
KCN (0,05 M)	0,05 ml
PMS (1,53 mg/ml in H ₂ O bidest)	0,05 ml
H ₂ O bidest.	ad 2 ml

d) Cytochrom c - O₂- Oxidoreductase (Cytochromoxidase)
(modifiziert nach Wharton und Tzagoloff, 1967)

Reaktionsmechanismus:



Cytochrom c wird durch Na₂S₂O₃ zu 90 - 95 % reduziert.

Gemessen wird die Abnahme der Absorption während der Oxidation von Cytochrom c durch O₂ bei 550 nm. Nach Beendigung des Tests

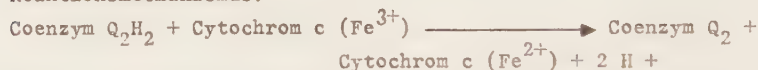
wird die Referenzküvette vollständig mit $K_3Fe(CN)_6$ oxidiert, um den Endpunkt der Oxidation des Cytochrom c zu bestimmen.

Reaktionsgemisch:

Phosphatpuffer (0,2 M, pH 7,2, 10 mM EDTA)	1,0 ml
Ferrocycytochrom c (52 mg/ml H_2O bidest.)	0,05 ml
$K_3Fe(CN)_6$ (0,1M)	0,02 ml

- e) Coenzym Q_2H_2 - Cytochrom c - Reductase (nach Rieske, 1967; modifiziert nach Lang, 1973)

Reaktionsmechanismus:



Gemessen wird die Extinktionszunahme während der Reduktion des Cytochrom c bei 550 nm.

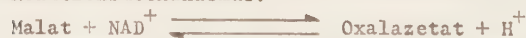
Reaktionsgemisch:

Ferricytochrom c (52 mg/ml H_2O bidest.)	0,05 ml
Coenzym Q_2H_2 (5 mg/ml)	0,0033 ml
KCN (9mM)	0,05 ml
Puffergemisch	ad 2 ml
Antimycin A (0,001 g/ml)	0,01 ml

Anmerkungen: Das Puffergemisch besteht aus 0,6 M Mannitol, 0,1 M KH_2PO_4 , 10 mM Tris, 10 mM Maleinsäure, 1 mM EDTA und wird mit KOH auf pH 6,5 eingestellt. Antimycin wird nach einiger Zeit zugegeben, um den durch Antimycin A nicht hemmbaren Anteil der Reaktion zu bestimmen.

- f) Malat- Dehydrogenase (nach Ochoa, 1955)

Reaktionsmechanismus:



Das Gleichgewicht liegt auf seiten des Malats. NADH wird in äquimolaren Mengen oxidiert und dient als Maßgröße; gemessen wird bei 340 nm.

Reaktionsgemisch:

Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,5)	0,3 ml
NADH (1,5 mM)	0,1 ml
Oxalazetat (7,6 mM, pH 7,5)	0,1 ml
H_2O bidest.	ad 3 ml

5.) Spektroskopische Untersuchungen

a) Cytochromspektren ganzer Zellen für Saccharomyces cerevisiae

Eine stationäre Kultur wird abzentrifugiert und zweimal in Wasser gewaschen. Die Zellen werden sehr konzentriert in 50 %igem Glycerin (Volumen/Volumen in Wasser) resuspendiert. Die sample- Küvette wird mit einer Spatelspitze Dithionit reduziert, die Referenzküvette mit etwas H_2O_2 oxidiert. Das Differenzspektrum wird in einem Cary 14 mit Streulichtzusatz von 650 - 400 nm aufgezeichnet.

b) Tieftemperatur- Cytochromspektren von ganzen Zellen (nach Sherman, 1964)

Stationär gewachsene Zellen von atmungsdefekten Mutanten werden mit einem Spatel von einer Glucose- Platte (bei der Untersuchung von ade 6 und ade 7 - Stämmen von Schizosaccharomyces pombe muß dem Medium 100 mg/l Adenin zugefügt werden, da die Bildung des roten Pigments das Spektrum empfindlich stört) abgekratzt und zwischen zwei Filterpapierstücken gepreßt. Der Zellbrei wird mit einem Spatel mit wenigen Körnchen Dithionit durchgeknetet. Auf einen Plexiglashalter wird ein Metallring von ca. 4 mm innerer Weite und 2 mm Höhe gelegt und die Öffnung mit dem Zellbrei gefüllt. Der Halter wird so lange in flüssigen Stickstoff getaucht, bis die Probe auf die Temperatur des Stickstoffs abgekühlt ist. Die Probe wird schnell in den Strahlengang eines Mikroskopes gebracht, bei dem das Okular durch ein Spektroskop ersetzt ist. Durch das Suchersystem einer aufgesetzten Kamera (Exakta Varex) können die Banden der Cytochrome auf dem Spektrum des sichtbaren Lichtes beobachtet werden. Diese Methode erlaubt erstens eine schnelle, wenn auch sehr grobe Vorklassifizierung atmungsdefekter Mutanten und zugleich eine photographische Aufnahme des Spektrums. Schwarzweiß- Negative und Hochglanzabzüge des Spektrums können im Densitometer untersucht werden und so die Intensität der einzelnen Banden aufgezeichnet werden.

c) Absolute Tieftemperaturspektren ganzer Zellen (Claisse et al., 1970)

Wie unter 5 b) beschrieben gewonnenen und Dithionit-

reduzierten Zellen werden in eine Küvette eingestrichen, in flüssigem Stickstoff vorgekühlt und das Spektrum bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs in einem Cary 15 (umbgebaut nach M. Claisse) aufgezeichnet.

- d) Differenzspektren differentiell gereinigter Mitochondrien, gradientengereinigter Mitochondrien und submitochondrialer Partikel

Die Küvetten mit den Suspensionen werden mit Dithionit reduziert und H_2O_2 oxidiert wie unter 5 a) beschrieben. Das Differenzspektrum der Cytochrome wird in einem Cary 14 mit Streulichtzusatz von 650 - 400 aufgezeichnet.

- e) Getrennte spektroskopische Darstellung der Cytochrome b und c_1 im Differenzspektrum (modifiziert nach Estabrook, 1958). Eine Suspension submitochondrialer Partikel wird auf die zwei Küvetten verteilt. Die Referenzküvette wird durch H_2O_2 oxidiert, in der sample- Küvette wird durch 1 mM KCN der Elektronenfluß zum Cytochrom $a.a_3$ gehemmt. Durch Zugabe von etwas kristallinem Ascorbat wird allein Cytochrom c_1 reduziert; das Differenzspektrum für Cytochrom c_1 wird in einem Cary Modell 14 aufgezeichnet. Zur Sichtbarmachung der Bande für Cytochrom b wird die gleiche Referenzküvette benutzt wie oben. Die sample- Küvette enthält 0,5 μM / mg Protein Antimycin A und wird durch Zugabe von etwas kristallinem Succinat reduziert. Der Block durch Antimycin A bewirkt, daß nur die b- Cytochrome, nicht aber c_1 reduziert wird. Dadurch kann ein Differenzspektrum der b- Cytochrome aufgezeichnet werden.

6.) Proteinbestimmung (Lowry et al., 1951)

Die Proteinkonzentration der Mitochondriensuspensionen wurde mit dem Folin- Phenol- Reagens in einem Photometer PMQ der Firma Zeiss bestimmt.

7.) Dichtebestimmung des Zuckers

Die Dichte des Zuckers in Rohruckergradienten wird durch Wiegen von 1,0 ml (im Pyknometer) bei 4° C bestimmt.

3.) Bestimmung der Glucosekonzentration (Yemm und Willis, 1954)

Die Glucosekonzentration wird mit dem Anthron- Reagens bestimmt. Diese Methode wurde jedoch weitgehend durch die schnellere Testmethode mit Glucotest- Streifen ersetzt.

A P P A R A T E

Zentrifuge Mistral 6L, MSE

Kühlzentrifuge Sorvall Superspeed RC 2-B, Fa. I. Sorvall

Ultrazentrifuge Spinco Modell L/L2, Fa. Beckman Instruments

Merkenschlager- Homogenisator, Fa. Braun, Melsungen

Sonifier Branson B 12, Branson Sonic Power Company, Danbury, Conn.

Photometer Eppendorf, Fa. Metheler und Minz, GmbH, Heidelberg

Photometer Beckman DB Grating mit 10'' Schreiber, Fa. Beckman

Photometer Cary Modell 14 mit Streulichtzusatz

Photometer Cary Modell 15 mit Tieftemperaturzusatz

Photoelektrisches Colorimeter Klett-Summerson, Klett Manufact. Co

Colorimeter Lumetron, Kontron AG, Zürich

Densitometer Chromoscan, Fa. Joyce-Loebl

Fraktionssammler Ultrorac LKB

Mikromanipulator Leitz mit Fernauge- System Fa 32 (Grundig)

Mikromanipulator De Fonbrune, Paris

Microforge De Fonbrune, Beaudouin, Paris

Literaturverzeichnis zum Abschnitt "Material und Methoden"

- Avner, P. R.; Coen, D.; Dujon, B.; Slonimski, P. P. :
Mitochondrial genetics IV. Allelism and mapping studies of
oligomycin resistant mutants in *Saccharomyces cerevisiae*.
Molec. Gen. Genetics, im Druck
- Bachofen, V.; Schweyen, R. J.; Wolf, K.; Kaudewitz, F.:
Quantitative selection of respiratory deficient mutants in
yeast by Triphenyltetrazolium chloride. Zeitschrift für
Naturforschung 27b, 252- 256, (1972)
- Bolotin, M.; Coen, D.; Deutsch, J.; Dujon, B.; Netter, P.;
Petrochilo, E.; Slonimski, P. P.: La recombinaison des
mitochondries chez *Saccharomyces cerevisiae*. Bulletin de
l'Institut Pasteur 69, 215- 239, (1971)
- Bostock, C. J.; Ph. D. Thesis, University of Edinburgh, Edin-
burgh, Scotland. Zitiert in: Referenz Mitchison, J. M. (1970)
- Claisse, M. L.; Péré- Aubert, G. A.; Clavilier, L. P.;
Slonimski, P. P.: Méthode d'estimation de la concentration
des cytochromes dans les cellules entières de levure.
Eur. J. Biochem. 16, 430- 438 (1970)
- Clavilier, L.; Péré, G.; Slonimski, P. P.: Mise en évidence
de plusieurs loci indépendants impliqués dans la synthèse
de l'iso- 2- cytochrome c chez la levure. Molec. Gen.
Genetics 104, 195- 218, (1969)
- Coen, D.; Deutsch, J.; Netter, P.; Petrochilo, E.; Slonimski, P.P.:
Mitochondrial genetics I. Methodology and phenomenology.
In: Control of organelle development. Symposia of the socie-
ty for experimental biology XXIV, P. Miller ed., Cambridge:
at the University Press, 449- 496, (1970)
- Colson, A. M.; Colson, C.; Goffeau, A.: Altérations génétiques
des membranes mitochondriales chez une levure petite négat-
ive.1. Enrichissement au 2- déoxyglucose. Euratombericht
1972, Annexe 4, 320, (1972)
- da Cunha, M. F.: Mitotic mapping of *Schizosaccharomyces pombe*.
Genet. Res., Camb. 16, 127- 144, (1970)

- Estabrook, R. W.: The spectral and enzymatic characterization of cytochrome c_1 of liver mitochondria. J. Biol. Chem. 230, 735, (1958)
- Fink, G. R.; Lowenstein, R.: Simplified method for testing mutagens in *Saccharomyces*. J. Bacteriol. 100, 1126- 1127, (1969)
- Foury, F.; Goffeau, A.: Glucose superrepressed and derepressed respiratory mutants in a "petite- negative" yeast, *Schizosaccharomyces pombe* 972h . Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 155- 160, (1972)
- Fowell, R. R.: Sodium acetate agar as a sporulation medium for yeast. Nature 170, 578, (1952)
- Fowell, R. R.: Sporulation and hybridization of yeast.
In: The Yeasts, Vol. I, A. H. Rose, J. S. Harrison eds., London, Academic Press, 303- 383, (1969)
- Calzy, P.; Slonimski, P. P. : Chimie biologique- variations physiologiques de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone.
C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris 245, 2423- 2426, (1957)
- Gutz, H.: Untersuchungen zur Feinstruktur der Gene ad7 und ad6 von *Schizosaccharomyces pombe*. Habilitationsschrift, Berlin, 1963
- Gutz, H.: Induction of mitotic segregation with p- fluorphenyl- alanine in *Schizosaccharomyces pombe*. J. Bacteriol. 92, 1567- 1568, (1966)
- Harm, W.; Haefner, K.: Decreased survival resulting from liquid- holding of U. V. - irradiated *Escherichia coli* C and *Schizosaccharomyces pombe*. Photochem. Photobiol. 8, 179- 192, (1968)
- Hawthorne, D. C.; Friis, J.: Osmotic- remedial mutants. A new classification for nutritional mutants in yeast. Genetics 50, 629- 639, (1964)
- Johnson, B. F.: Growth of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, with late, excentric, lytic fission in an unbalanced medium. J. Bacteriol. 94, 192- 195, (1967)

- Knolle, P.; Lüdke, H. J.: Einfache Geräte zur Herstellung und zur Auslauffraktionierung von Dichtegradienten. Acta biol. med. german. 16, 222- 227, (1966)
- Lang, F.: persönliche Mitteilung
- Leupold, U.: Methodisches zur Genetik von Schizosaccharomyces pombe. Schweiz. Z. Path. Bakt. 18, 1141- 1146, (1950a)
- Leupold, U.: Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei Schizosaccharomyces pombe. Compt. rend. Lab. Carlsberg Sér. physiol. 24, 381- 480, (1950 b)
- Leupold, U.: Versuche zur genetischen Klassifizierung adenin-abhängiger Mutanten von Schizosaccharomyces pombe. Arch. Julius Klaus- Stift. Vererbungsforsch. 30, (15. Jahresber. S. S. G.), 506- 516, (1955)
- Leupold, U.: Some data on polyploid inheritance in Schizosaccharomyces pombe. Compt. rend. Lab. Carlsberg Sér. physiol. 26, 221- 251, (1956)
- Leupold, U.: Physiologisch- genetische Studien an adenin- abhängigen Mutanten von Schizosaccharomyces pombe, ein Beitrag zum Problem der Pseudoallelie. Schweiz. Z. Allgem. Pathol. Bakteriolog. 20, 535- 544, (1957)
- Leupold, U.: Studies on recombination in Schizosaccharomyces pombe. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 23, 161 - 170, (1958)
- Leupold, U.: Genetical methods for Schizosaccharomyces pombe. In: Methods in cell physiology, Vol. 4, D. M. Prescott ed., Academic Press, New York, 169- 177, (1970)
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.: Protein measurement with the folin reagent. J. Biol. Chem. 209, 23 - 39, (1951)
- Mattenheimer, H.: Mikromethoden für das klinisch- chemische und biochemische Laboratorium. 2. Auflage, Walter de Gruyter & Co, Berlin, 1966

- Mattoon, J. R.; Balcanage, W. X.: Properties of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria prepared by a mechanical method. *Biochim. Biophys. Acta* 150, 521- 530, (1968)
- McClary, D. O.; Multy, W. L.; Miller, G. R.: Effect of K versus Na in the sporulation of *Saccharomyces*. *J. Bacteriol.* 73, 362- 368, (1959)
- Megnet, R.: A method for the selection of auxotrophic mutants of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Experientia* 20, 320- 321, (1964)
- Megnet, R.: Effect of 2- deoxyglucose on *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* 90, 1032- 1035, (1965)
- Mitchison, J. M.: The growth of single cells. I. *Schizosaccharomyces pombe*. *Exptl. Cell Res.* 13, 244- 262, (1957)
- Mitchison, J. M.: Physiological and cytological methods for *Schizosaccharomyces pombe*. In: *Methods in cell physiology*, Vol 4, D. M. Prescott ed., Academic Press, New York- London, 131- 165, (1970)
- Mortimer, R. K.; Hawthorne, D. C.: Yeast genetics. In: *The yeasts*, Vol I, A. H. Rose, J. S. Harrison eds., Academic Press, New York- London, 385 - 460, (1969)
- Munz, P.; Leupold, U.: Characterization of ICR- 170- induced mutations in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mutation Res.* 9, 199- 212, (1970)
- Netter, P.; Petrochilo, E.; Slonimski, P. P.; Dolotin- Fukuhara, M.; Coen, D.; Deutsch, J.; Dujon, B.; *Mitochondrial Genetics VI, in Vorbereitung*
- Ogur, M.; Lindegren, G.; Lindegren, C. C.: A simple screening test for genetic studies of respiration deficiency in yeast. *J. Bacteriol.* 68, 391- 392, (1954)
- Ogur, M.; St. John, R.: A differential and diagnostic plating method for population studies of respiratory deficiency in yeast. *J. Bacteriol.* 72, 500- 504, (1956)

- Ogur, M.; St. John, R.; Nagai, S.: Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast. *Science* 125, 928-929, (1957)
- Ogur, M.; St. John, R.; Ogur, S.; Mark, A. M.: The direct estimation of mutation rate from mutant frequency under special conditions. *Genetics* 44, 483 - 496, (1959)
- Olson, B. H.; Johnson, M. J.: Factors producing high yeast yields in synthetic media. *J. Bacteriol.* 57, 235- 246, (1949)
- Ochoa, S.: Malic dehydrogenase from pig heart. In: *Methods in enzymology*, Vol I, S. P. Colowick, N. O. Kaplan eds., Academic Press, New York- London, 735 - 739, (1955)
- Peck, R. M.; Preston, R. K.; Creech, H. J.: Mono- and difunctional analogs of some quinoline and acridine nitrogen mustards. *J. Org. Chem.* 26, 3409- 3414, (1961)
- Pittman, D.; Webb, J. M.; Roschanmanesh, A.; Coker, L. E.: Evidence for the genetic control of photoreactivation. *Genetics* 45, 1025- 1037, (1960)
- Preston, R. K.; Peck, R. M.; Breuninger, E. R.; Miller, A. J.; Creech, H. J.: Further investigations of heterocyclic alkylating agents. *J. Med. Chem.* 7, 471- 480, (1964)
- Rieske, J. S.: Preparation and properties of reduced coenzyme Q-cytochrome c reductase (complex III of the respiratory chain) In: *Methods in enzymology*, Vol X, R. W. Estabrook, M. E. Pullman eds., Academic Press, New York- London, 239- 245, (1967)
- Rauen, H. M.: *Biochemisches Taschenbuch*, H. M. Rauen ed., 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin- Göttingen- Heidelberg, 1964
- Sanadi, D. R.; Pharo, R. L.; Sordahl, L. A.: NADH- CoQ reductase-assay and purification. In: *Methods in enzymology*, Vol X, R. W. Estabrook, M. E. Pullman eds., Academic Press, New York- London, 297- 302, (1967)

- Schatz, G.: Stable phosphorylating submitochondrial particles from baker's yeast. In: Methods in enzymology, Vol X, R. W. Estabrook, M. E. Pullman eds., Academic Press, New York-London, 197 - 202, (1967)
- Schüpbach, M.: The isolation and genetic classification of UV-sensitive mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. Mutation Res. 11, 361- 371, (1971)
- Schweyen, R. J.: Genetische und biochemische Untersuchungen zur mitochondrialen Proteinsynthese and der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, München, 1971
- Sels, A.; Jakob, H.: Acceleration of cytochrome oxidase synthesis specific to zygotes from crosses between complementary respiratory deficient mutants of *S. cerevisiae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 453- 459, (1967)
- Sherman, F.; Slonimski, P. P.: Respiration- deficient mutants of yeast. II. Biochemistry. Biochim. Biophys. Acta 90, 1 - 15, (1964)
- Sherman, F.; Stewart, J. W.; Parker, J. H.; Inhaber, E.; Shipman, N. A.; Putterman, G. J.; Gardisky, R. L.; Margoliash, E.: The mutational alteration of the primary structure of yeast iso- 1- cytochrome c. J. Biol. Chem. 243, 5444- 5456, (1968)
- Tisdale, H. D.: Preparation and properties of succinic- cytochrome c reductase (complex II- III). In: Methods in enzymology, Vol X, R. W. Estabrook, M. E. Pullman eds., Academic Press, New York- London, 213- 215, (1967)
- Wickerham, L. J.: A critical evaluation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeast. J. Bacteriol. 52, 293- 301, (1946)
- Wolf, K.; Sebald- Althaus, M.; Schweyen, R. J.; Kaudewitz, F.: Respiration deficient mutants of *Schizosaccharomyces pombe* I. Molec. Gen. Genetics 110, 101- 109, (1971)
- Wolf, K.; Dujon, B.; Slonimski, P. P.: Mitochondrial genetics V. Multifactorial mitochondrial crosses involving a mutation conferring paromomycin- resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. Molec. Gen. Genetics, im Druck

- Yemm, E. W.; Willis, A. J.: The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem. J.* 57, 508- 514, (1954)
- Ziegler, D.; Rieske, J. S.: Preparation and properties of succinate dehydrogenase- coenzyme Q reductase (complex II). In: *Methods in enzymology*, Vol X, R. W. Estabrook, M. E. Pullman eds., Academic Press, New York- London, 231- 235, (1967)

ERGEBNISSE

I. Vorbemerkungen zur Genetik und Physiologie der beiden verwendeten Organismen: *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*

I. 1) Lebenszyklen

Während sich *Saccharomyces cerevisiae* vegetativ durch Knospung vermehrt (Fig. 1), erfolgt die Vermehrung bei *Schizosaccharomyces pombe* durch Querteilung (Fig. 2) (Conti und Naylor, 1960; Suminoe und Dukmo, 1963; MacLean, 1964; Johnson, 1965; Streiblova et al., 1966; Yuasa et al., 1967; Robinow, 1969; McCully, 1971). *Saccharomyces cerevisiae* ist in der vegetativen Phase bevorzugt diploid und die Sporulation muß daher durch Überimpfen in bestimmte Medien (Fowell, 1969) eingeleitet werden. *Schizosaccharomyces pombe* hingegen ist ein haploider Organismus, dessen Diplophase auf die Zygote beschränkt ist (Leupold, 1950 b). In der Zygote finden sofort Reduktionsteilungen und Ascosporenbildung statt, die Asci zerfallen anschließend spontan. Diploide sind nur dann stabil, wenn sie bezuglich des Paarungstyps homozygot sind (Leupold, 1970).

I. 2) Paarungstypen

I. 2. 1) *Saccharomyces cerevisiae*

Ein Allelpaar, α und α , bestimmt den Paarungstyp, wobei auch homothallische Stämme dieselben Paarungstypallele aufweisen (Lindegren und Lindegren, 1944). Das homothallische Paarungsverhalten wird durch ein epistatisches Gen D bestimmt (Hawthorne, 1960). Durch α - α -Fusion oder Endomitose kann es zu

diploiden Zellen in einer haploiden Population kommen (Roman et al., 1951); Diploide homozygoter Paarungstypkonfiguration entstehen durch mitotisches crossing-over (Mortimer, 1958). Für die im Rahmen dieser Arbeit ausgeführten Kreuzungsanalysen können diese Vorgänge weitgehend außer acht gelassen werden. Für Schizosaccharomyces pombe sind jedoch gerade die Stabilität und das Verhalten der Paarungstypen in Kreuzungsanalysen von großer Bedeutung, so daß hier kurz darauf eingegangen werden muß.

I. 2. 2) Schizosaccharomyces pombe

Bei Schizosaccharomyces pombe Stamm liquefaciens Osterwalder (dieser Stamm wurde 1947 von Leupold aus der Hefeabteilung des Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft, bezogen), von dem sich alle hier verwendeten Stämme ableiten, sind zwei heterothallische (h^+ und h^-) und ein homothallischer (h^{00}) Paarungstyp bekannt. (Über die Natur des früher beschriebenen zweiten homothallischen Paarungstyps h^{40} siehe Leupold, 1950b) Kreuzt man heterothallische Stämme untereinander, so beobachtet man die Bildung von seltenen (etwa 0,4 %) homothallischen Sporen. Dieses Verhalten führte zu der Erklärung, daß das Paarungsverhalten durch zwei eng gekoppelte Loci (h_1 und h_2) bestimmt wird (Leupold, 1958). Der Genotyp der verschiedenen Paarungstypen wäre also: $h_1^+h_2^+$ und $h_1^+h_2^0$ = heterothallisch +, $h_1^-h_2^0$ = heterothallisch -, $h_1^-h_2^+$ = homothallisch. Kopulation und Sporulation ist möglich für Kombinationen entgegengesetzter heterothallischer Paarungstypkonfigurationen, für alle Kombinationen heterothallischer Paarungstypen mit dem homothallischen Paarungstyp und für Zellen des homothallischen Paarungstyps untereinander.

(Fig. 4) Sämtliche Paarungstypen sind voneinander durch Mutation ableitbar, wie in Fig. 5 schematisch dargestellt ist. Wie oben erwähnt, entsteht in jeder Kreuzung heterothallischer Stämme ein gewisser Prozentsatz homothallischer Nachkommensporen. In einer Kreuzung $h^{+N} \times h^{-}$ entstehen neben Sporen der parentalen Paarungstypen auch Rekombinantensporen der Paarungstypen h^{+R} und h^{90} , bei der Kreuzung $h^{+R} \times h^{90}$ neben den Parentaltypen die Rekombinantentypen h^{+N} und h^{-} (Fig. 6). Die beiden heterothallischen (+)- Paarungstypen h^{+R} und h^{+N} können jedoch leicht voneinander unterschieden werden. In Ausstrichen von Zellen des Paarungstyps h^{+N} erkennt man nach Jodbedampfung (siehe Kapitel Material und Methoden) einzelne jodpositive Stellen, das heißt Ansammlungen sporulierender Zellen, welche auf Mutationen von h^{+N} nach h^{90} zurückgeführt werden können (Fig. 5). Ausstriche von h^{+R} - Zellen sind dadurch gekennzeichnet, daß nichtsporulierende Regionen durch eine schmale jodpositive Linie getrennt sind. Die Sporulation wird hervorgerufen durch das Vorhandensein von h^{-} - Zellen, welche durch Mutation aus den h^{+R} - Zellen entstanden sind und nun mit den h^{+R} - Zellen kopulieren. Stämme des Paarungstyps h^{-} sind sehr stabil und daher für genetische und biochemische Untersuchungen besonders gut geeignet.

I. 2) Wachstum von Schizosaccharomyces pombe in verschiedenen

Medien

Schizosaccharomyces pombe wächst gut auf den meisten für Hefe beschriebenen Medien. Optimale Bedingungen sind hierbei eine Debrütungstemperatur von 28- 36° C (Fig. 8) und gute Durch-

mischung der Kultur. Bei Zimmertemperatur ist das Wachstum von Schizosaccharomyces pombe stark vermindert, wobei eine Erniedrigung der Temperatur mit einer Verlängerung der Zellen verbunden ist. Bei 30° C ist die Zellgröße von haploiden Zellen etwa 8 - 12 u, die von diploiden etwa 16 - 19 u. Die Größenverhältnisse von haploiden Zellen, diploiden Zellen und Asci sind in Fig. 7 wiedergegeben. Das gebräuchlichste Medium für diesen Organismus ist Hefeextraktmedium mit Glucose (2 - 3 %, Gewicht/Volumen) als Kohlenstoffquelle. In diesem Medium beträgt die Generationszeit bei guter Durchlüftung und 30° C Bebrütungstemperatur etwa 2,5 Stunden, wobei ein Endtiter von etwa 2×10^8 Zellen/ml erreicht wird (Fig. 9). Steigende Glucosekonzentrationen (1- 10 %) ergeben steigende Zellausbeute, wie in Fig. 43 dargestellt ist. Der pH dieses Mediums liegt bei 6,0; eine Erniedrigung des pH auf 4,5 ergibt nur geringe Verbesserung von Wachstumsgeschwindigkeit und Ausbeute.

Das einzige nichtvergärbare Substrat, mit dem Schizosaccharomyces pombe gutes Wachstum zeigt, ist Glycerin. Man erreicht in einem Hefeextraktmedium mit 3 % Glycerin bei pH 6,5 eine Generationszeit von 350 Minuten, bei pH 4,5 eine Verdopplungszeit von 240 Minuten und einen Endtiter von etwa 8×10^7 Zellen/ml für beide pH- Werte. Äthanol und Malat als Kohlenstoffquelle ergeben nur sehr geringes, Pyruvat, Azetat, DL- Lactat und Glutamat kein signifikantes Wachstum (Heslot, 1970).

In Malzmedium, welches meist als Sporulationsmedium verwendet wird, beträgt die Verdopplungszeit etwa 2,5 Stunden.

Ausgehend vom Minimalmedium nach Wickerham wurden für Schizosaccharomyces pombe von verschiedenen Gruppen Minimalmedien entwickelt, deren Eignung mit dem Wildtypstamm 972h⁻ geprüft wurde. Das Minimalmedium nach Leupold, sowie das Edinburgh-Minimalmedium 2 (EMM 2) und das semisynthetische Minimalmedium aus Yeast Nitrogen Base mit KH_2PO_4 und/oder Asparagin mit Glucose als Kohlenstoffquelle sind gleich gut geeignet. Für diese Medien ergibt sich eine Verdopplungszeit von etwa 2,5 - 3 Stunden, wobei ein Endtiter von etwa 4×10^7 Zellen erreicht wird. Edinburgh-Minimalmedium 1 (EMM 1) erwies sich für den Stamm 972h⁻ als nicht günstig, weil Phosphat in diesem Medium limitierend ist und daher der Titer nicht wesentlich über 10^7 Zellen/ml steigt. (Fig. 11) Eine Zusammenfassung der Medien mit den erreichten Verdopplungszeiten und Endtitern ist in Tab. 1 gegeben.

I. 4) Zusammenfassung

- 1) Die Lebenszyklen des bevorzugt diploiden Saccharomyces cerevisiae und des bevorzugt haploiden Schizosaccharomyces pombe werden verglichen.
- 2) Das für die genetische Arbeit bedeutsame Paarungstypverhalten von Schizosaccharomyces pombe wird dem von Saccharomyces cerevisiae gegenübergestellt.
- 3) Es wird die Eignung verschiedener Medien für Schizosaccharomyces pombe besprochen.

I. 5) Diskussion

Saccharomyces cerevisiae ist durch seine Bevorzugung der di-

ploiden Phase gut für Komplementationsanalysen geeignet, während bei Schizosaccharomyces pombe Diploide erst stabilisiert werden müssen. Andererseits zerfallen die Asci von Schizosaccharomyces pombe spontan und Ascosporen können durch Alkoholabtötung der vegetativen Zellen aus dem Kreuzungsgemisch selektiert werden. Diese Technik macht besonders Kreuzungsanalysen im intragenen Bereich bei Schizosaccharomyces pombe sehr einfach, welche bei Saccharomyces cerevisiae nur mit wesentlich größerem experimentellem Aufwand durchgeführt werden können (Mortimer und Hawthorne, 1966). Die Wachstumsgeschwindigkeit und Ausbeute liegt bei Schizosaccharomyces etwas niedriger als bei Saccharomyces (Generationszeit in Hefeextrakt- Pepton- Vollmedium mit 3 % Glucose etwa 1 - 1,5 Stunden, Endtiter etwa 4×10^8 Zellen/ml), ein geringer Nachteil für biochemische Untersuchungen.

Der Nachteil der, verglichen mit Saccharomyces (Fig. 13), wesentlich unvollständigeren Chromosomenkarte bei Schizosaccharomyces pombe (Fig. 12) wird in nächster Zeit durch die Kartierungsarbeiten der Leupold'schen Gruppe (Leupold, persönliche Mitteilung) weitgehend ausgeglichen werden, so daß Schizosaccharomyces pombe und Saccharomyces cerevisiae für genetische Arbeiten adäquate Organismen darstellen, wobei jede Hefe Vorteile und Nachteile für die Bearbeitung bestimmter genetischer Problemstellungen besitzt.

I. 6) Literaturverzeichnis zum Abschnitt "Ergebnisse I"

Conti, S. F.; Naylor, H. B.: Electron microscopy of ultrathin sections of *Schizosaccharomyces octosporus*. I. Cell division. *J. Bacteriol.* 78, 868- 877, (1960)

Fowell, R. R.: Sporulation and hybridization of yeast.
In: The yeasts, Vol. I, A. H. Rose, J. S. Harrison eds.,
London, Academic Press, 303- 383, (1969)

Hawthorne, D. C.: A deletion in yeast and its bearing on the structure of the mating locus. *Genetics* 48, 1727- 1729, (1963)

Heslot, H.; Goffeau, A.; Louis, C.: Respiratory metabolism of a "petite negative" yeast *Schizosaccharomyces pombe* 972h⁻. *J. Bacteriol.* 104, 473- 481, (1970)

Johnson, B. F.: Autoradiographic analysis of regional cell wall growth of yeasts. *Schizosaccharomyces pombe*.
Exptl. Cell Res. 39, 613- 624, (1965)

Leupold, U.: Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *Compt. rend. Lab. Carlsberg. Sér. physiol.* 24, 381- 480, (1950b)

Leupold, U.: Studies on recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 23, 161- 170, (1958)

Leupold, U.: Genetical methods for *Schizosaccharomyces pombe*.
In: *Methods in cell physiology*, Vol 4, D. M. Prescott ed.,
New York, 169- 177, (1970)

Lindgren, C. C.; Lindgren, G.: Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bot. Gaz.* 105, 304, (1944)

MacLean, N.: Electron microscopy of a fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* 88, 1459- 1466, (1964)

McCully, E. K.; Robinow, C. F.: Mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: a comparative study with light and electron microscopy. *J. Cell Sci.* 9, 475- 507, (1971)

- Mortimer, R. K.: Radiat. Res. 9, 312- 326, (1958); zitiert in: The yeasts, Vol I, A. H. Rose, J. S. Harrison eds., London, Academic Press, Abschnitt Yeast genetics.
- Mortimer, R. K.; Hawthorne, D. C.: Yeast genetics. In: The yeasts, Vol I, A. H. Rose, J. S. Harrison eds., Academic Press, New York- London, 385- 460, (1969)
- Robinow, C. F.: Mitosis in *Schizosaccharomyces versatilis*. Antonie van Leeuwenhoek, Yeast Symposium 1969, The proceedings of the third international symposium in yeast, Delft, the Hague, J 3/4, (1969)
- Roman, H.; Hawthorne, D. C.; Douglas, H. C.: Polyploidy in yeast and its bearing on the occurrence of irregular genetic ratios. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 37, 79- 84, (1951)
- Streiblová, E.; Málek, I.; Bevan, K.: Structural changes in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe* during cell division. J. Bacteriol. 91, 428- 435, (1966)
- Suminoe, K; Dukmo, H.: The life cycles of *Schizosaccharomyces* with reference to the mode of conjugation and ascospore formation. J. gen. appl. Microbiol. Tokyo 9, 243- 247, (1963)
- Yuasa, A.; Osumi, M.; Mazuzawa, E.: Cytological studies of *Schizosaccharomyces pombe*. Jap. J. Genet. 43, 451, (1963) 40th Ann. Meeting Genet. Soc. Jap.

II. Mutagene Behandlung

II. 1) Mutagene Behandlung mit N-methyl- N'-nitro- N-nitrosoguanidin (= Nitrosoguanidin = NG)

Dieses alkylierende Agens ist eines der am häufigsten bei Hefe angewandten Mutagene und wurde auch zur Induktion oder Reversion auxotropher (Friis et al., 1971; Loprieno und Clarke, 1965; Megnet, 1965; Munz und Leupold, 1970; Nasim, 1967; Nasim und Auerbach, 1967; Segal, 1969), UV-sensibler (Schüpbach, 1971 ab) und temperatursensibler (Bonatti et al., 1972) Mutanten bei Schizosaccharomyces pombe verwendet.

II. 1. 1) Inaktivierung durch Nitrosoguanidin

Alle Mutationsinduktionen wurden bei pH 5,0 ausgeführt, da NG bei diesem pH stabil ist. Der Prozentsatz der Inaktivierung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer wurde für Mutagenkonzentrationen von 1 mg bzw. 2 mg/ml Inkubationsgemisch durch Plattieren bestimmt. Der Zelltitel der Suspension betrug 2×10^8 /ml, die Inkubationstemperatur 30° C. Die Inaktivierungskurven für beide Mutagenkonzentrationen sind in Fig. 14 dargestellt. Bei der geringeren Mutagenkonzentration beobachtet man ab 120 Minuten einen gleichbleibenden Wert der Inaktivierung; dieser Effekt wird anschließend diskutiert.

II. 1. 2) Mutationsinduktion mit Nitrosoguanidin

Wenn nicht anders angegeben, wurden Mutationsinduktionen mit 2 mg NG/ml und 35 Minuten Behandlungsdauer ausgeführt. Dies ergab eine Überlebensrate von etwa 5 % und eine Häufigkeit atmungsdefekter Mutanten von etwa 10^{-3} .

II. 2) Mutagene Behandlung mit ultraviolettem Licht (UV)

Ultraviolettes Licht, ein in der Pilzgenetik häufig verwendetes mutagenes Agens wurde auch bei Schizosaccharomyces pombe zum Studium seiner mutagenen und lethalen Wirkung angewandt (Auerbach, 1967; Clarke, 1962, 1963, 1965, 1968a, 1968b; Gutz, 1961; Haefner, 1966, 1967; Haefner und Howrey, 1967; Heslot, 1960, 1962; Leupold, 1961; Loprieno und Clarke, 1965; Nasim, 1967, 1968, Nasim und Auerbach, 1967; Ramirez et al., 1963).

II. 2. 1) Inaktivierung durch UV- Bestrahlung

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Inaktivierung von der Bestrahlungsdauer wurden Proben von 10 ml (Zelltiter 2×10^7 /ml) bestrahlt, zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen, in eisgekühltem Medium verdünnt und plattiert. Die Inaktivierungskurve für die in "Methoden" beschriebenen Bedingungen ist in Fig. 15 gezeigt.

II. 2. 2) Mutationsinduktion mit UV

Für die Induktion atmungsdefekter Mutanten wurde durchwegs 150 Sekunden bestrahlt. Dies ergab bei einer Überlebensrate von ca. 2 % eine Häufigkeit atmungsdefekter Mutanten von $5 - 10 \times 10^{-4}$. Als biologische Eichung der UV- Lampe wurden zwei Stämme von *Escherichia coli*, *E. coli* B und der UV- resistente Stamm *E. coli* B/r unter gleichen Bedingungen bestrahlt. Es wurden je 10 ml einer $2 \times$ gewaschenen Übernachtskultur bestrahlt.

Für 60 Sekunden Bestrahlung ergab sich eine Überlebensrate für *E. coli* B von 10^{-3} % und für *E. coli* B/r von 0,3 %.

II. 3) Mutationsinduktion mit salpetriger Säure

Salpetrige Säure wurde auch bei Schizosaccharomyces pombe bei Induktion und Reversion auxotropher Mutanten angewandt (Clarke, 1962, 1965a, 1965b; Clarke und Nasim, 1964; Guglielminetti, 1968; Guglielminetti et al., 1967; Gutz 1961, 1963; Leupold, 1961; Leupold und Gutz, 1965; Loprieno et al., 1968; Loprieno und Clarke, 1965; Loprieno et al., 1969; Michel et al., 1966; Nasim, 1967; Nasim und Clarke, 1965; Nasim und James, 1970). Man kann aufgrund der Befunde von Siddiqi (1967) an Aspergillus nidulans vermuten, daß die salpetrige Säure in der Pilz- DNS ähnliche Veränderungen wie in der Phagen- und Bakterien- DNS hervorruft.

Die Überlebensrate wurde bei einer mutagenen Behandlung von 7 Minuten unter den angegebenen Bedingungen zu etwa 5 % bestimmt; diese Zeit wurde für die Induktion benutzt. Die Mutationshäufigkeit zur Atmungsdefizienz betrug etwa 5×10^{-4} und liegt damit in der Größenordnung der UV-Mutagenese.

II. 4) Mutationsinduktion mit ICR- 170

ICR- 170 ist eines aus einer Serie von Acridin- Senfgasabkömmlingen, welche von Creech und Mitarbeitern als potente Antitumor- Agenzien synthetisiert wurden (Literatur über ICR- 170 siehe Abschnitt "Methoden"). Seine Strukturformel als auch die Formeln seiner Bestandteile sind in Fig. 16 dargestellt. Verschiedene Verbindungen aus dieser Reihe sind als Mutagene bei verschiedensten Organismen angewandt worden (Alderson, 1969; Ames und Whitfield, 1966; Brockman und Goben, 1965; Brusick, 1970; Magni und Puglisi, 1966;

Malamy, 1966; Munz und Leupold, 1970; Sederoff, 1966). Munz und Leupold (1970) induzierten mit diesem Mutagen bei Schizosaccharomyces ade 6 und ade 7 - Mutanten. Die von den Autoren angegebene Konzentration von 5 µg/ml Inkubationsgemisch wurde für die Induktion atmungsdefekter Mutanten übernommen, wobei die Inkubationsdauer durchwegs 3 Stunden betrug.

II. 5) Mutationsinduktion auf festem Medium mit ICR- 170, Methylmethansulfonat und Diäthylsulfat unter wachsenden Bedingungen

Die alkylierenden Agenzien Methylmethansulfonat (MMS) und Diäthylsulfat (DIÄ) wurden bei Schizosaccharomyces verschiedentlich zur Induktion auxotropher Mutanten angewandt (MMS: Heslot, 1960, 1962; Loprieno, 1966, 1967; Loprieno et al., 1969; DIÄ: Heslot, 1960, 1962).

ICR- 170, Diäthylsulfat und Methylmethansulfonat wurden als Kristalle oder als Flüssigkeit (verdünnt oder unverdünnt) in der Mitte einer Hefeextrakt- Glucose- Platte aufgetragen, auf welcher vorher ein Rasen des zu mutierenden Stammes gestempelt wurde. Während des Wachstums diffundiert das Mutagen in den Agar und es wird nach einigen Tagen Bebrütung ein Hemmhof sichtbar. Diese Methode wurde von Fink und Lowenstein (1969) als Reversionstest für Saccharomyces cerevisiae beschrieben und hier als Vorwärtsmutationssystem auf Schizosaccharomyces pombe angewandt. In einem Vorversuch wurde zuerst die geeignete Mutagenkonzentration ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengestellt, wobei die später verwendeten Konzentrationen mit (+) gekennzeichnet sind. Nach Bebrütung wurde Material aus der Randzone um den Hemmhof

abisiert, welches die mutierten Zellen enthält. Im Unterschied zu den vorher beschriebenen Methoden erstreckt sich die Mutagenese auf den gesamten Zellzyklus.

II. 6) Mutationsinduktion durch ^{32}P - Zerfall

Beim radioaktiven Zerfall eines ^{32}P - Atoms wird ein beta- Elektron emittiert, während der Kern eines Schwefelatoms zurückbleibt. Hershey et al. (1951) konnten nachweisen, daß die Inaktivierung von Phagenpartikeln bei radioaktiver Umsetzung von eingebauten ^{32}P - Atomen nicht durch Ionisation verursacht wird. Vielmehr muß die Inaktivierung durch eine Nahwirkung der atomaren Umwandlung des Phosphors in Schwefel entstehen. Bei Bakterien führt der Zerfall nach Einbau in die DNS nicht nur zur Inaktivierung (Fuerst und Stent, 1956), sondern mit zunehmender Zerfallzeit des Phosphors treten unter den Überlebenden Zellen (bei *Escherichia coli*) eine steigende Anzahl von Mutanten auf (Kaudewitz et al., 1958; Kaudewitz, 1961). Bei *Saccharomyces cerevisiae* wurde der Zerfall radioaktiven Phosphors ebenfalls zur Mutagenese und zur Induktion mitotischer Rekombination verwendet (Koroliov und Grachiova, 1971). Diese Methode wurde für *Schizosaccharomyces* mit dem Ziele angewandt, durch Zerfall des in die Mitochondrien- DNS eingebauten radioaktiven Phosphors mitochondriale Mutationen zu erhalten.

Die Zellen wurden in ethidiumbromidhaltigem Medium angezüchtet, um sie in einen instabilen Zustand zu versetzen, dessen Charakteristika von Luha et al., (1971), Heslot et al., (1970) und Schwab und Kaudewitz (1971) für *Kluyveromyces lactis* bzw. *Schizosaccharomyces* beschrieben wurden. Die nach langem Wachstum in ethidiumbromid-haltigem Medium entstandenen

"phänotypischen petites" besitzen keine biochemisch nachweisbare mitochondriale DNS, wachsen nicht mehr auf Glycerinmedium, erhalten ihre Atmungsfähigkeit jedoch wieder, wenn sie auf ethidiumbromid-freies Medium gebracht werden. Offensichtlich besitzen Zellen in diesem Zustand sehr wenig (oder keine?) mitochondriale DNS. Um ^{32}P selektiv in stark verringerte mitochondriale DNS einbauen zu können, wurde die Kernproteinsynthese mit Cycloheximid gehemmt. Die von W. Bandlow auf diese Weise induzierten atmungsdefekten Mutanten wurden freundlicherweise zur biochemischen und genetischen Charakterisierung zur Verfügung gestellt.

II. 7) Mutationsinduktion mit Acriflavin

Die drei atmungsdefekten Mutanten pet 1, pet 2 und pet 3 wurden von Bulder (1963, 1964a, 1964b) unter wachsenden Bedingungen auf acriflavinhaltigem Medium induziert und freundlicherweise zu Verfügung gestellt.

II. 8) Zusammenfassung

Mit UV- Bestrahlung, den chemischen Mutagenen Nitrosoguanidin, Methylmethansulfonat, Diäthylsulfat, ICR- 170 und Acriflavin, sowie durch Zerfall von ^{32}P wurden atmungsdefekte Mutanten von Schizosaccharomyces pombe induziert. Die Mutagene Methylmethansulfonat und Diäthylsulfat wurden ausschließlich unter wachsenden, ICR- 170 unter wachsenden und nichtwachsenden Bedingungen angewandt. Eine Zusammenfassung der Mutanten und ihrer Mutagene ist in Tab. 9 gegeben.

II. 9) Diskussion

II. 9. 1) Auswahl der mutagenen Agenzien

Um eine möglichst große Vielfalt an Mutantentypen als Unter-

suchungsmaterial für die genetische und biochemische Charakterisierung zu erhalten, wurden neben spontan entstandenen Mutanten auch solche isoliert, welche mit Mutagenen verschiedener Wirkungsmechanismen induziert worden waren. Verschiedene Wirkungsmechanismen liegen auch der Mutagenese durch ultraviolette Bestrahlung und Zerfall von ^{32}P zugrunde. Nitrosguanidin, Methylmethansulfonat und Diäthylsulfat sind Mutagene mit meist basensubstituierender Wirkung, während Acridine (wie ICR- 170) meist zur Addition oder Deletion von Basenpaaren führen. Die Zugehörigkeit der hier induzierten atemungsdefekten Mutanten zu genetischen Klassen wurde zwar nicht geprüft, doch läßt sich aus Untersuchungen an auxotrophen Mutanten von Schizosaccharomyces pombe (Segal, 1969; siehe Abschnitt Mutationsinduktion mit NG) die ungefähre Verteilung auf die verschiedenen Gruppen ableiten. Fast alle mit MMS, NG und EMS (Äthylmethansulfonat) induzierten Mutanten im ade 1-Locus waren das Ergebnis von Missense- und Nonsensemutationen des ochre-, amber- oder opal- Typs und somit Basensubstitutionsmutanten. Die ICR- 170- induzierten Mutanten stellten eine heterogene Gruppe dar, welche etwa zur Hälfte aus Mutanten des Basensubstitutionstyps und Rasterschub- Typs bestand. Eine ähnliche Verteilung ist wohl auch für die atemungsdefekten Mutanten zu erwarten - ein Punkt späterer Untersuchungen. Die meisten der bisher nach UV- Bestrahlung gefundenen Mutanten bei Schizosaccharomyces pombe sind Punktmutanten (Als Punktmutanten werden hier solche bezeichnet, welche nach mutagener Behandlung revertieren), sehr selten Deletionen (Leupold, persönliche Mitteilung). Da mit ähnlichem

Inaktivierungsprozentsatz gearbeitet wurde, gilt dies wohl auch für die hier induzierten Mutanten.

II. 9. 2) Die Nitrosoguanidin- Mutagenese

Die Inaktivierungskurve für die niedrigere Nitrosoguanidinkonzentration zeigt, daß ab 120 Minuten (weiterer Kurvenverlauf nicht dargestellt) keine weitere Inaktivierung mehr erfolgt. Dasselbe Phänomen wurde von Schweyen (1968) bei *E. coli* beobachtet. Dieser Effekt läßt sich am besten dadurch erklären, daß Nitrosoguanidin oder seine Abbauprodukte mit der Dauer der Inkubation seine Fähigkeit zur Inaktivierung in zunehmendem Maße verliert. Daher ist eine weitere Aufnahme unveränderten Nitrosoguanidins aus dem Außenmedium infolge Sättigung der Zelle nicht möglich.

II. 9. 3) Mutagenese mit Acriflavin?

Mit allen bisher getesteten Acridinen (nicht mit den Acridin-Senfgas- Verbindungen wie die ICR- Serie) konnten bisher keine auxotrophen Mutanten bei Hefe induziert werden. Dies wurde auch von Munz und Leupold (1970) für 9- Aminoacridin und Schizosaccharomyces pombe bestätigt. Andererseits induzieren Acridine bei Saccharomyces cerevisiae in hohem Maße extrachromosomal vererbte petites. Die wenigen nach Acriflavinbehandlung auftretenden atmungsdefekten Mutanten bei Schizosaccharomyces pombe sind daher wahrscheinlich spontan entstandene atmungsdefekte Mutanten oder, wenn auch wegen ihrer geringen Zahl unwahrscheinlich, extrachromosomal vererbte atmungsdefekte Mutanten. Die zweite Möglichkeit soll an diesen und mehreren anderen atmungsdefekten Mutanten geprüft und im nächsten Abschnitt besprochen werden.

II. 10) Literaturverzeichnis zum Abschnitt "Ergebnisse II"

Mutagenese mit Nitrosoguanidin

- Bonatti, S.; Simili, M.; Abbondandolo, A.: Isolation of temperature- sensitive mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. J. Bacteriol. 109, 484- 491, (1972)
- Friis, J.; Flury, F.; Leupold, U.: Characterization of spontaneous mutations of mitotic and meiotic origin in the ad-1 locus of *Schizosaccharomyces pombe*. Mutation Res. 11, 373- 390, (1971)
- Loprieno, N.; Clarke, C. H.: Investigations on reversions to methionine independence induced by mutagens in *Schizosaccharomyces pombe*. Mutation Res. 2, 312- 319, (1965)
- Megnet, R.: Screening of auxotrophic mutants of *Schizosaccharomyces pombe* with 2- deoxyglucose. Mutation Res. 2, 328- 331, (1965)
- Munz, P.; Leupold, U.: Characterization of ICR- 170- induced mutations in *Schizosaccharomyces pombe*. Mutation Res. 9, 199- 212, (1970)
- Nasim, A.: The induction of replicating instabilities by mutagens in *Schizosaccharomyces pombe*. Mutation Res. 4, 753- 763, (1967)
- Nasim, N.; Auerbach, C.: The origin of complete and mosaic mutants from mutagenic treatment of single cells. Mutation Res. 4, 1- 14, (1967)
- Segal, E.: Charakterisierung chemisch induzierter Mutationen im ad- 1- Locus von *Schizosaccharomyces pombe*. Dissertation, Bern, 1969
- Schüpbach, M.: Isolierung, Charakterisierung und genetische Klassifizierung UV- sensitiver Mutanten von *Schizosaccharomyces pombe*. Dissertation, Bern, 1971a
- Schüpbach, M.: The isolation and genetic classification of UV- sensitive mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. Mutation Res. 11, 361- 371, (1971)

Schweyen, R. J.: Zur inaktivierenden und mutagenen Wirkung von N- Methyl- N'- nitro- N- Nitrosoguanidin bei *Escherichia coli* und *Neurospora crassa*. Diplomarbeit, München (1968)

Mutagenese mit ultravioletttem Licht

Auerbach, C.: Lethal sectoring and the origin of complete mutants in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mutation Res.* 4, 875- 878, (1967)

Clarke, C. H.: A case of mutagen specificity attributable to a plating medium effect. *Z. Vererbungslehre* 93, 435- 440, (1962)

Clarke, C. H.: Suppression by methionine of reversions to adenine independence in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Gen. Microbiol.* 31, 353- 363, (1963)

Clarke, C. H.: Mutagen specificity among reversions of ultra-violet- induced adenine- 1 mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genet. Res. Camb.* 6, 433- 441, (1965)

Clarke, C. H.: Differential effects of caffeine in mutagen-treated *Schizosaccharomyces pombe*. *Mutation Res.* 5, 33- 40, (1968a)

Clarke, C. H.: Differential effects of a dark- repair- system in *Schizosaccharomyces pombe*. *Heredity* 25, 103- 108, (1968b)

Gutz, H.: Distribution of X- ray- and nitrous acid- induced mutations in the genetic fine structure of the *ad7* locus of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 191, 1125- 1126, (1961)

Haefner, K.: Dose- dependence of the segregation pattern of UV- induced lethality in pedigrees derived from phased *Schizosaccharomyces pombe*. *Photochem. Photobiol.* 5, 587- 590, (1966)

Haefner, K.: Concerning the mechanism of ultraviolet mutagenesis. A micromanipulatory pedigree analysis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 57, 169- 178, (1967)

Haefner, K.; Howrey, L.: Gene- controlled UV- sensitivity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mutation Res.* 4, 219- 221, (1967)

- Heslot, H.: Schizosaccharomyces pombe: un nouvel organisme pour l'étude de la mutagenèse chimique. Abhandl. Deut. Akad. Wiss. Berlin Kl. Med., 98- 105, (1960)
- Heslot, H.: Étude quantitative de réversions biochimiques induites chez la levure Schizosaccharomyces pombe par des radiations et des substances radiomimétiques. Abhandl. Deut. Akad. Wiss. Berlin Kl. Med., 193- 228, (1962)
- Leupold, U.: Intragene Rekombination und allele Komplementierung. Arch. Julius Klaus- Stift. Vererbungsforsch. 36, (21. Jahresber. S. S. G.), 89- 117, (1961)
- Loprieno, N.; Clarke, C. H.: Investigations on reversions to methionine independence induced by mutagens in Schizosaccharomyces pombe. Mutation Res. 2, 312-319, (1965)
- Nasim, A.: The induction of replicating instabilities by mutagens in Schizosaccharomyces pombe. Mutation Res. 4, 753- 763, (1967)
- Nasim, A.: Repair- mechanisms and radiation- induced mutations in fission yeast. Genetics 59, 327- 323, (1968)
- Nasim, A.; Auerbach, C.: The origin of complete and mosaic mutants from mutagenic treatment of single cells. Mutation Res. 4, 1- 14, (1967)
- Ramirez, C.; Friis, J.; Leupold. U.: Allelic recombination and complementation in adenine- requiring mutants of Schizosaccharomyces pombe. In: Genetics today, Vol 1, Proc. 11th Intern. Congr. Genet. 1, 7, (1963)

Mutagenese mit salpetriger Säure

- Clarke, C. H.: A case of mutagen specificity attributable to a plating medium effect. Z. Vererbungslehre 93, 435 - 440, (1962)
- Clarke, C. H.: Methionine as an antimutagen in Schizosaccharomyces pombe. J. Gen. Microbiol. 39, 21- 31, (1965a)
- Clarke, C. H.: Mutagen specificity among reversions of ultra-violet- induced adenine- 1 mutants of Schizosaccharomyces pombe. Genet. Res. Camb. 6, 433 - 441, (1965b)
- Clarke, C. H.; Nasim, A.: Mutant expression delay in a nitrous acid forward- mutation system in Schizosaccharomyces pombe. Heredity 19, 530- 531, (1964)
- Guglielminetti, R.: The role of lethal sectoring in the origin of complete mutations in Schizosaccharomyces pombe. Mutation Res. 5, 225- 229, (1968)
- Guglielminetti, R.; Bonatti, S.; Loprieno, N.; Abbondandolo, A.: Analysis of the mosaicism induced by hydroxylamine and nitrous acid in Schizosaccharomyces pombe. Mutation Res. 4, 441- 447, (1967)
- Gutz, H.: Distribution of X- ray and nitrous acid- induced mutations in the genetic fine structure of the ad7 locus of Schizosaccharomyces pombe. Nature 191, 1125- 1126, (1961)
- Gutz, H.: Untersuchungen zur Feinstruktur der Gene ad7 und ad6 von Schizosaccharomyces pombe Lind. Habilitationsschrift, Berlin, 1963
- Leupold, U.: Intragene Rekombination und allele Komplementierung. Arch. Julius Klaus- Stift. Vererbungsforsch. 36, (21. Jahresber. S. S. G.), 89- 117, (1961)
- Leupold, U.; Gutz, H.: Genetic fine structure in Schizosaccharomyces pombe. In: Genetics today, Vol 2, S. J. Geerts ed., Proc. 11th Intern. Congr. Genet. 2, Pergamon Press, Oxford, 31- 35, (1965)

- Loprieno, N.; Abbondandolo, A.; Bonatti, S.; Guglielminetti, R.: Analysis of the genetic instability induced by nitrous acid in *Schizosaccharomyces pombe*. Genet. Res. Camb. 12, 45- 54, (1968)
- Loprieno, N.; Clarke, C. H.: Investigations on reversions to methionine independence induced by mutagens in *Schizosaccharomyces pombe*. Mutation Res. 2, 312- 319, (1965)
- Loprieno, N.; Guglielminetti, R.; Bonatti, S.; Abbondandolo, A.: Evaluation of the genetic alterations induced by chemical mutagens in *Schizosaccharomyces pombe*. Mutation Res. 8, 65- 71, (1969)
- Michel, E.; Melen, M.; Loprieno, N.: Reversion studies with ad7 "hot spot" mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. Rend. Accad. Naz. Lincei 40, 1123- 1128, (1966)
- Nasim, A.: The induction of replicating instabilities by mutagens in *Schizosaccharomyces pombe*. Mutation Res. 4, 753- 763, (1967)
- Nasim, A.; Clarke, C. H.: Nitrous acid- induced mosaicism in *Schizosaccharomyces pombe*. Mutation Res. 2, 395- 402, (1965)
- Nasim, A.; James, A. P.: Inactivation and the induction of lethal sectoring by chemical mutagens in yeast. Can. J. Genet. Cytol. 12, 10- 14, (1970)
- Siddiqi , O. H.: The fine genetic structure of the paba- 1 region of *Aspergillus nidulans*. Genet. Res. 3, 69- 89, (1962)

Mutationsinduktion mit ICR- 170

- Alderson, T.: Spontaneous and induced reversion of ICR- 170- induced xanthine dehydrogenase mutants of *Aspergillus nidulans*, Mutation Res. 8, 521- 529, (1969)
- Ames, B. N.; Whitfield jr., H. J.: Frameshift mutagenesis in *Salmonella*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 221- 225, (1966)

- Brockman, H. E.; Goben, W.: Mutagenicity of a monofunctional alkylating agent derivative of acridine in *Neurospora*. *Science* 147, 750- 751, (1965)
- Brusick, D. J.: The mutagenic activity of ICR- 170 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.* 10, 11- 19, (1970)
- Magni, G. E.; Puglisi, P. P.: Mutagenesis of super- suppressors in yeast. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31, 699- 704, (1966)
- Malamy, M. H.: Frameshift mutations in the lactose operon of *E. coli*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31, 189- 201, (1966)
- Munz, P.; Leupold, U.: Characterization of ICR- 170- induced mutations in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mutation Res.* 9, 199- 212, (1970)
- Sederoff, R. R.: The mutational mechanism of ICR- 170, a monofunctional quinacrine mustard, on T4 bacteriophage. Ph. D. dissertation, Univ. of California, Los Angeles, 1966
- Mutationsinduktion mit Methylmethansulfonat (MMS) und Diäthylsulfat (DIÄ)
- Heslot, H.: *Schizosaccharomyces pombe*: un nouvel organisme pour l'étude de la mutagenèse chimique. Abhandl. Deut. Akad. Wiss. Berlin Kl. Med., 98- 105, (1960) (MMS, DIÄ)
- Heslot, H.: Étude quantitative de réversions biochimiques induites chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* par des radiations et des substances radiomimétiques. Abhandl. Deut. Akad. Wiss. Berlin Kl. Med., 193- 228, (1962) (MMS, DIÄ)
- Loprieno, N.: Differential response of *Schizosaccharomyces pombe* to ethyl methanesulfonate and methyl methanesulfonate. *Mutation Res.* 3, 486- 493, (1966) (MMS)
- Loprieno, N.: Intragenic mapping of chemically induced ad-7 mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* 94, 1162- 1165, (1967) (MMS)

Loprieno, N.; Guglielminetti, R.; Bonatti, S.; Abbondandolo, A.:
Evaluation of the genetic alterations induced by chemical
mutagens in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mutation Res.* 8,
65- 71, (1969) (MMS)

Mutationsinduktion durch ^{32}P - Zerfall

Fuerst, C. R.; Stent, G. S.: Inactivation of bacteria by de-
cay of incorporated radioactive phosphorus. *J. gen. Physiol.*
40, 73, (1956)

Hershey, A. D.; Kamen, M. O.; Kennedy, J. W.; Gest, H.: The
mortality of bacteriophage containing assimilated radio-
active phosphorus. *J. gen. Physiol.* 34, 305, (1951)

Heslot, H.; Louis, C.; Goffeau, A.: Segregational respiratory-
deficient mutants of a "petite negative" yeast *Schizo-*
saccharomyces pombe 972h⁻. *J. Bacteriol.* 104, 482- 491,
(1970)

Kaudewitz, F.: Isotope bei genetischen Untersuchungen.
In: Künstliche radioaktive Isotope in Physiologie, Dia-
gnostik und Theraphie, 2. Auflage, Herausgeber H. Schwiegl
und F. Turba, Springer- Verlag Berlin- Göttingen- Heidel-
berg, 367- 392, (1961)

Kaudewitz, F.; Vielmetter, W.; Friedrich- Freska, H.:
Mutagene Wirkung des Zerfalles von radioaktivem Phosphor
nach Einbau in Zellen von *Escherichia coli*. *Z. Naturforsch.*
13b, 193, (1958)

Koroliov, V. G.; Grachiova, L. M.: The induction of mitotic
recombination in yeast by the decay of the incorporated
phosphorus isotope P-32. *Genetika* 7, 147- 153, (1971)

Luha, A. A.; Sarcoe, L. E.; Whittaker, P. A.: Biosynthesis
of yeast mitochondria. Drug effects on the petite nega-
tive yeast *Kluyveromyces lactis*. *Biochem. Biophys. Res.*
Commun. 44, 396- 402, (1971)

Schwab, R.; Sebal, M.; Kaudewitz, F.: Influence of ethi-
dium bromide on respiration in *Schizosaccharomyces pombe*.
Molec. Gen. Genetics 110, 361- 366, (1971)

Mutationsinduktion durch Acriflavin

Bulder, C. J. E. A.: On respiratory deficiency in yeast.

Dissertation, Delft, Technische Hogeschool, 1963

Bulder, C. J. E. A.: Induction of petite mutation and inhibition of synthesis of respiration in various yeasts.

Antonie van Leeuwenhoek 30, 1- 9, (1964a)

Bulder, C. J. E. A.: Lethality of the petite mutation in

petite negative yeasts. Antonie van Leeuwenhoek 30, 442- 454, (1964b)

III. Die genetische Natur der Atmungsdefizienz bei *Schizosaccharomyces pombe*

III. 1) Petite- positive und petite- negative Hefen

Bulder (1960, 1964a, 1964b; Zitate unter II. 10) klassifizierte eine Reihe von Hefen nach ihrer Fähigkeit, nach Wachstum auf acriflavinhaltigem Medium zur Atmungsdefizienz zu mutieren, wobei er einer petite- positiven Gruppe eine petite- negative Gruppe gegenüberstellt. Als petite- positiv bezeichnete er Hefen, welche nach längerem Kontakt mit Acriflavin 50 - 100 % atmungsdefekte Mutanten ergaben. Zu dieser Gruppe gehören verschiedene Vertreter der Gattungen *Saccharomyces* (Hauptvertreter *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces carlsbergensis*), *Torulopsis*, *Candida*, *Blöeckera* und *Brettanomyces*. Als petite negativ erkannte er Vertreter der Gattungen *Hansenula*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Saccharomycodes*, *Hanseniospora*, *Nadsonia*, *Torulopsis*, *Candida*, *Blöeckera*, *Brettanomyces* und auch *Schizosaccharomyces octosporus*. Die Trennung petite- positiv/petite- negativ geht also eher durch einzelne Gattungen (doppelt unterstrichen). *Brettanomyces lambicus*, *Saccharomyces florentinus* und *Schizosaccharomyces pombe* nehmen eine Mittelstellung ein. Hier treten atmungsdefekte Mutanten relativ selten auf und sind deshalb schwieriger zu isolieren.

III. 2) Atmungsdefekte Mutanten bei *Saccharomyces cerevisiae*

Behandelt man *Saccharomyces cerevisiae* mit Acriflavin, so erhält man bei den Nachkommen bis zu 100 % Atmungsdefekte. (Avers et al., 1965; Ephrussi, 1949; Ephrussi und Lottinguer,

1950; Ephrussi et al., 1949; Marcovich, 1952; Nagai, 1959; Slonimski und Ephrussi, 1949; Slonimski und de Robichon-Szulmajster, 1957). Alle diese petites erwiesen sich nach den Kriterien, welche später ausführlicher besprochen werden sollen, als extrachromosomal vererbt. Vegetative petites werden aber auch durch die klassischen Mutagene UV (Maroudas und Wilkie, 1968; Pittman, 1959; Raut, 1954; Wilkie, 1968) und NG (Mayer und Legator, 1970; Nordström, 1967), sowie auch durch ICR-170 (Werkheiser, 1971; Werkheiser und Pittman, 1972) induziert. Die Induktion atmungsdefekter Mutanten bei Schizosaccharomyces pombe durch Acriflavin läßt vermuten, daß es sich bei diesen von Bulder isolierten petites um extrachromosomal vererbte handelt. Da UV, alkylierende Agenzien und ICR neben chromosomal vererbten ebenfalls extrachromosomale petites bei Saccharomyces cerevisiae induzieren, sollten folglich auch unter den mit diesen Mutagenen induzierten atmungsdefekten Mutanten von Schizosaccharomyces pombe solche mit nicht-mendelndem Erbgang zu finden sein. Im folgenden soll durch genetische Analyse geprüft werden, ob hier eine extrachromosomale Mutation zur Atmungsdefizienz analog zu der bei Saccharomyces cerevisiae beschriebenen vorliegt.

III. 2. 1) Mitochondriale atmungsdefekte Deletionsmutanten (ρ^-) bei Saccharomyces cerevisiae

Bei der Kleinkoloniemutante (cytoplasmatische petite = vegetative petite = ρ^- -petite) findet man bezüglich ihres Gehaltes an mitochondrialer DNS zwei verschiedene Typen, die sich im Kreuzungsexperiment unterscheiden lassen. Der eine Typ ist durch das völlige Fehlen extrahierbarer Mitochondrien-

DNS charakterisiert und wird deshalb als ρ^0 oder ρ neutral bezeichnet. Der andere Typ enthält etwa gleiche Mengen mitochondrialer DNS wie der Wildtyp, jedoch mit geringerer oder höherer Schwimmdichte. Dieser Typ wird als ρ^- suppressive bezeichnet. (Bernardi et al., 1970; Ephrussi und Grandchamp, 1965; Ephrussi et al., 1966; Faye et al., 1973; Goldring et al., 1970; Mollenberg et al., 1972; Mehrotra und Mahler, 1969; Michaelis et al., 1971; Mounolou, 1967; Mounolou et al., 1966; Moustacchi und Williamson, 1966; Nagley und Linnane, 1970, 1972; Rabinowitz, 1968; Rank, 1970 ab; Whittaker, 1969)

III. 2. 1. 1) Die ρ^0 - oder neutral petite

Kreuzt man eine ρ^0 - petite mit einem Wildtyp, so erhält man lauter atmungskompetente diploide Nachkommen. Bringt man solche Diploide zur Sporulation, so erweisen sich alle 4 Meioseprodukte als atmungskompetent, während eine 2 : 2 Aufspaltung für Paarungstypen und auxotrophe Marker vorliegt. (Fig. 18)

III. 2. 1. 2) Die ρ^- - suppressive petites

Kreuzt man eine ρ^- - suppressive petite mit einem Wildtyp, so erhält man eine diploide Population, die sich aus atmungsdefekten und atmungskompetenten Zellen zusammensetzt. Der Grad der "Suppressivität", das heißt der Prozentsatz atmungsdefekter Diploider schwankt von petite zu petite und für die einzelne petite für verschiedene Kreuzungspartner, ist aber für eine petite mit einem bestimmten Kreuzungspartner unter standardisierten Bedingungen konstant (Jakob, 1962). Gelingt es, eine Diploide sofort nach Zygotenbildung zur Sporulation zu bringen, so sind die Nachkommen der 4 Meioseprodukte alle atmungsdefekt. Nach einigen Generationen ist es jedoch nicht

mehr möglich, eine diploide petite zu sporulieren. Bringt man eine atmungskompetente petite zur Sporulation, so sind die Nachkommen aller 4 Sporen atmungskompetent. Diese Zusammenhänge sind in Fig. 19 schematisch dargestellt. Beiden petites ist gemeinsam, nicht zur Atmungskompetenz zu revertieren und nicht untereinander zu komplementieren. Im Gegensatz dazu stehen allerdings die Untersuchungen von Kraepelin (1964) und Rank und Person (1969), die über eine Reversion einer extrachromosomalen petite zur Atmungskompetenz berichten.

III. 2.2) Mitochondriale Punktmutationen bei Saccharomyces

Mitochondriale Deletionsmutanten des ρ^- - Typs sind bei Saccharomyces sehr häufig; sie treten bereits spontan bei manchen Stämmen in Prozenzhäufigkeiten auf. Mitochondriale Punktmutanten hingegen sind wesentlich seltener. Es wäre deshalb von vorneherein nicht auszuschließen, daß es sich bei den in Schizosaccharomyces induzierten petites um solche Punktmutationen handeln könnte. Für Saccharomyces sind in dieser Gruppe jedoch nur Mutationen zur Antibioticaresistenz und Verlust des ρ - Faktors, also zur sekundären Atmungsdefizienz bekannt (Handwerker et al., 1973). Die Kriterien einer solchen mitochondrialen Punktmutation sind: Segregation der mitochondrialen Marker, nicht aber der Kernmarker, während des vegetativen Cyclus, 2. keine Segregation der mitochondrialen Marker, wohl aber der Kernmarker, während der Meiose. Eine schematische Darstellung dieser Kriterien anhand der mitochondrial vererbten Resistenzen gegen Chloramphenicol und Erythromycin ist in Fig. 20 gegeben.

Für Saccharomyces sind genetische Analysen gearbeitet worden, um sowohl die beiden Typen der ρ^- - Mutanten

als auch die mitochondrialen Punktmutanten von kernkodierten Mutanten zu unterscheiden. Im folgenden soll nun geprüft werden, ob es sich bei den atemungsdefekten Mutanten von Schizosaccharomyces um analoge Mutantentypen wie bei Saccharomyces handelt. Das Auftreten folgender Mutantentypen muß geprüft werden:

- a) mitochondriale Deletionsmutanten des ρ^0 - Typs,
 - b) mitochondriale Deletionsmutanten des ρ^- - suppressive-Typs,
 - c) mitochondriale Punktmutanten,
 - d) kernkodierte atemungsdefekte Mutanten (segregational petites).
- Die Übertragbarkeit solcher Tests und die Einschränkungen, welche bei solchen Analogieschlüssen gemacht werden müssen, sollen am Ende diskutiert werden.

III. 3) Genetische Analyse der petites bei Schizosaccharomyces pombe

Die Segregation der Atemungsdefizienz in der Meiose wurde bei 150 Mutanten durch Freisporanalyse, bei 16 Mutanten durch Tetradenanalyse im Rückkreuzungsverfahren geprüft.

III. 3. 1) Reinigung und Reisolierung der atemungsdefekten Mutanten vor den Kreuzungsanalysen

Wie in Abschnitt I der Ergebnisse dargestellt, müssen besonders Mutanten des h^+ - Paarungstyps laufend getestet und gereinigt werden, um eine Anhäufung homothallischer Zellen zu vermeiden, welche die Kreuzungsergebnisse verfälschen würden. Alle Mutanten und Kreuzungspartner wurden jeweils getestet, ob sie die ursprünglichen Auxotrophien, den richtigen Paarungstyp und die Atemungsdefizienz trugen. Ferner wurde geprüft, ob die

Mutanten noch im haploiden Zustand vorlagen. Der Vorgang der Reisolierung ist in Fig. 21 schematisch dargestellt.

III. 3. 2) Freisporanalyse im Rückkreuzungsverfahren

150 atmungsdefekte Mutanten wurden nach Reinigung mit einem atmungskompetenten Stamm gekreuzt und die Nachkommensporen durch Alkoholabtötung der vegetativen Zellen selektiert. Die Sporensuspension wurde in geeigneten Verdünnungen auf Hefe-extrakt- Glucose- Medium plattiert, die daraus hervorgehenden Kolonien zur Bestimmung der Aufspaltung der Atmungsdefizienz bzw. Atmungskompetenz und der auxotrophen Marker auf Glycerin-medium, bzw. die passend supplementierten Minimalmedien gestempelt. In allen untersuchten Fällen zeigte sich eine Aufspaltung in atmungskompetente und atmungsdefekte Nachkommen. Zieht man den Vergleich zum Saccharomyces- System, so müßten im Falle einer Mutation des ρ^0 - Typs bei Schizosaccharomyces alle Kolonien atmungskompetent sein, da sich in jeder Zelle nun auch Mitochondrien des Wildtyps befinden. Eine dem suppressive- Typ entsprechende Mutation könnte jedoch nicht mit Hilfe der Freisporanalyse, sondern nur mittels Tetradenanalyse erkannt werden. Da bei Schizosaccharomyces Sporulation meist unmittelbar auf die Zygotenbildung erfolgt, wäre Sporulation einer Diploiden möglich, deren Nachkommen ausschließlich atmungsdefekt sind (Fig. 19). Da in der Freisporanalyse nur die Gesamtnachkommenschaft, nicht aber die einzelnen Meioseprodukte eines Askus untersucht werden, könnte hier ein Gemisch von atmungsdefekten (durch sofortige Sporulation entstanden) und atmungskompetenten (durch Sporulation nach einigen Teilungen der Zygote) Zellen vorliegen.

Eine Abweichung des 50 : 50 - Verhältnisses bei RC und RD konnte in den meisten Fällen einer unterschiedlichen Lebensfähigkeit der Kreuzungspartner zugeschrieben werden, welche sich in einer ungleichen Verteilung der auxotrophen Marker zeigt (Beispiele: Kreuzung pet 38 ade 7 x 88h⁺ his 2; pet 49 ade 7 x 88h⁺ his 2; Tab. 3). Ein Teil der aberranten Aufspaltungsergebnisse hat sicher seine Ursache in nichtreziproker Rekombination oder einer zweiten Mutation zur Atmungsdefizienz. Eine solche Doppelmutation soll später noch ausführlicher besprochen werden. Die Ergebnisse der Freisporanalyse sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

III. 3. 3) Tetradenanalyse im Rückkreuzungsverfahren

16 atmungsdefekte Mutanten wurden mit verschiedenen atmungskompetenten Stämmen zurückgekreuzt und die entstandenen Ascosporen mit dem Mikromanipulator getrennt ausgelegt. Die Nachkommen der Ascosporen wurden hinsichtlich der Aufspaltung der Atmungsdefizienz und der auxotrophen Marker getestet. Die auxotrophen Marker spalteten mit gewissen Ausnahmen meist 2 : 2. In fast allen Kreuzungen zeigte sich neben 1 RC: 3 RD- und 3 RC: 1 RD-Aufspaltungen auch 2 RC : 2 RD- Tetraden. (Tab. 3) Schließt man wieder analog zum Saccharomyces- System, so kann durch Tetradenanalyse für diese 16 Mutanten eine Mutation des suppressive-Typs ausgeschlossen werden. Im Falle einer solchen Mutation müßten ausschließlich Tetraden der Typen 4 RC: 0 RD oder 0 RC : 4 RD auftreten.

III. 3. 4) Mitotische Segregation

Durch Tetradenanalyse können beide Typen der rho⁻- Mutation geprüft und für die im Vorliegenden untersuchten Schizosaccharomyces - petites ausgeschlossen werden. Eine mitochondriale

Punktmutation kann aber nur durch mitotische Segregation und nachfolgende Tetradenanalyse nachgewiesen werden. Da Schizosaccharomyces sofort nach der Zygotenbildung sporuliert, ist es weder möglich, die Segregation während der Mitose zu verfolgen, noch eine Diploide, deren Segregation abgelaufen ist, in der Tetradenanalyse zu testen. Möglichkeiten der mitotischen Segregation und eine kritische Betrachtung ihrer Anwendung bei Schizosaccharomyces werden anschließend diskutiert.

III. 4) Zusammenfassung

- 1.) Die verschiedenen Typen mitochondrialer Mutationen bei Saccharomyces cerevisiae werden beschrieben und Tests für ihre Charakterisierung als extrachromosomale Mutationen angegeben.
- 2.) Es wird die Frage gestellt, ob anhand der gleichen Kriterien entsprechende Mutanten unter petites von Schizosaccharomyces zu finden sind.
- 3.) Durch Freisporanalyse konnte gezeigt werden, daß 150 RD-Mutanten nicht dem ρ^0 - Typ angehören.
- 4.) Mit Hilfe der Tetradenanalyse konnte für 16 dieser Mutanten ihre Zugehörigkeit zum ρ^0 - und suppressive-Typ ausgeschlossen werden.
- 5.) Mitochondriale Punktmutationen können bei Schizosaccharomyces wegen der Instabilität der Diploiden weder durch mitotische Segregation noch durch nachfolgende Tetradenanalyse geprüft werden.

III. 5) Diskussion

Im Laufe der hier vorliegenden Arbeiten berichteten andere Autoren darüber, daß sie bei Schizosaccharomyces pombe ebenfalls nur kernkodierte atmungsdefekte Mutanten erhielten (Goffeau et al., 1972; Heslot et al., 1970). Auch ihre Ergebnisse bestätigen, daß es sich bei Bulders Mutanten um kernkodierte Mutanten handelt.

Die primäre Frage im Falle von Schizosaccharomyces pombe ist nicht, ob mitochondriale Mutationen induziert werden können, sondern ob sie sich manifestieren und dadurch nachgewiesen werden können. Durch einen bisher unbekannten Mechanismus wird die gemischte Mitochondrienpopulation einer Zygote bei Saccharomyces gezwungen, innerhalb weniger Generationen auseinander zu segregieren. Eine solche Aufteilung kann im Falle der ρ^0 -Mutation in einer Diploiden mit einem Wildtypstamm einfach dadurch erfolgen, daß sich die petite-Mitochondrien langsam herausverdünnen. Welcher Mechanismus aber liegt der Segregation mitochondrialer Punktmutationen oder der ρ^- -suppressive-Mutation zugrunde? Ein Mechanismus, bei dem sich petite-mitochondriale DNS schneller replizieren sollte, scheidet für suppressive-petites aus, da sie dem Wildtyp in der Länge vergleichbare mitochondriale DNS besitzen. Mitochondriale DNS mit Punktmutationen hätte also auch keinen Replikationsvorteil. Ein anderer Mechanismus wird viel diskutiert, welcher einen bevorzugten Transport mutierter Mitochondrien in die Knospen bewerkstelligt. Sollte die Segregation der heterogenen Mitochondrienpopulation durch ungleiche Verteilung auf Mutterzellen und Knospen erfolgen, so ist kaum denkbar, einen Mechanis-

mus asymmetrischer Aufteilung des Plasmas auch bei Schizosaccharomyces zu finden, der sich mit größter Regelmäßigkeit querteilt.

Um eine potentielle mitochondriale Mutation bei Schizosaccharomyces bezüglich ihrer möglichen Segregation während der mitotischen Teilungen zu testen, müßten konditionelle Mutanten eingesetzt werden, bei denen Schritte zwischen Zygotenbildung und Reduktionsteilung temperatursensibel sind. Die bisher angewandte Methode der Stabilisierung der Diploiden erfordert nämlich eine zu große Zahl von Generationen, während der die Segregation ablaufen kann und so nicht erfaßt wird.

Im eventuellen Fehlen eines Segregationsmechanismus ist also eine Erklärungsmöglichkeit zu suchen, weshalb bei Schizosaccharomyces pombe bis jetzt auch keine mitochondrialen Mutationen zur Antibioticaresistenz gefunden werden konnten.

III. 6) Literaturverzeichnis zum Abschnitt "Ergebnisse III"

- Avers, C. J.; Pfeffer, C. R.; Rancourt, M. M.: Acriflavine induction of different kinds of "petite" mitochondrial populations in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 90, 481- 494, (1965)
- Bernardi, G.; Faures, M.; Piperno, G.; Slonimski, P. P.: Mitochondrial DNA's from respiratory- sufficient and cytoplasmic respiratory- deficient mutant yeast. *J. Molec. Biol.* 48, 23- 42, (1970)
- Ephrussi, B.: Action de l'acriflavine sur les levures. Colloques internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique. Unités Biologiques données de Continuité Génétique, Paris, (1949)
- Ephrussi, B.; Grandchamp, S.: Études sur la suppressivité des mutants a deficiencie respiratoire de la levure. I. Existence au niveau cellulaire de divers "degrés de suppressivité". *Heredity* 20, 1- 7, (1965)
- Ephrussi, B.; Hottinguer, H.: Direct demonstration of the mutagenic action of euflavine on baker's yeast. *Nature* 166, 956, (1950)
- Ephrussi, B.; Hottinguer, H.; Chimenes, A. M.: Action de l'acriflavin sur les levures. I. La mutation "petite colonie". *Ann. Inst. Pasteur* 76, 351- 367, (1949)
- Ephrussi, B.; Jakob, H.; Grandchamp, S.: Études sur la suppressivite chez les mutants à déficiencie respiratoire de la levure. II. Étapes de la mutation grande en petite provoquée par le facteur suppressif. *Genetics* 54, 1- 29, (1966)
- Faye, G.; Fukuhara, H.; Grandchamp, C.; Lazowska, J.; Michel, F.; Casey, J.; Getz, G. S.; Locker, J.; Rabinowitz, M.; Bolotin- Fukuhara, M.; Coen, D.; Deutsch, J.; Dujon, B.; Netter, P.; Slonimski, P.P.: Mitochondrial nucleic acids in the petite colonie mutants: Deletions and repetitions of genes. *Biochimie* 55, im Druck.

- Goffeau, A.; Colson, A. M.; Landry, Y.; Foury, F.: Modifications of mitochondrial ATPase in chromosomal respiratory-deficient mutants of a "petite-negative" yeast: *Schizosaccharomyces pombe* 972h⁻. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 1448- 1454, (1972)
- Goldring, E. S.; Grossman, L. I.; Krupnick, D.; Cryer, D. R.; Marmur, J.: The petite mutation in yeast. Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide. *J. Molec. Biol.* 52, 323- 335, (1970)
- Handwerker, A.; Schweyen, R. J. ; Wolf, K.; Kaudewitz, F.: Evidence for an extrakaryotic mutation affecting the maintenance of the rho factor in yeast. *J. Bacteriol.* 113, 1307- 1310, (1973)
- Heslot, H.; Louis, C.; Goffeau, A.: Segregational respiratory-deficient mutants of a "petite negative" yeast *Schizosaccharomyces pombe* 972h⁻. *J. Bacteriol.* 104, 482- 491, (1970)
- Hollenberg, C. P.; Borst, P.; Flavell, R. A.; Kreijl, C. F. van; Bruggen, E. F. J. van; Arnberg, A. C.: The unusual properties of mtDNA from a "low-density" petite mutant of yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 277, 44- 58, (1972)
- Jakob, H.: Technique de synchronisation de la formation des zygotes chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. *Compt. rend. Acad. Sci.* 254, 3909- 3911, (1962)
- Kraepelin, G.: Normalisierung des Atmungsdefektes bei Hefe. Rückführung stabilisierter RD- Mutanten in voll atmungsfähige Normalzellen. *Arch. Mikrobiol.* 48, 299- 305, (1964)
- Marcovich, H.: Rapports entre la structure des acridines et leur activité en tant qu'agents indicateurs de mutants respiratoires chez la levure. *Annales de l'Institut Pasteur* 85, 199- 203, (1953)
- Maroudas, N. G.; Wilkie, D.: Ultraviolet irradiation studies on the cytoplasmic determination of the yeast mitochondrion. *Biochim. Biophys. Acta* 166, 681- 688, (1968)

- Maver, V. W.; Legator, M. S.: Induction by N- methyl- N'-nitro- N- nitrosoguanidine and UV light of petite mutants in aerobically and anaerobically cultivated *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.* 9, 193- 198, (1970)
- Mehrotra, D. D.; Mahler, H. R.: Characterization of some unusual DNAs from the mitochondria from "petite" *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 128, 685- 703, (1969)
- Michaelis, G.; Douglass, S.; Tsai, M. J.; Criddle, R. S.: Mitochondrial DNA and suppressiveness of petite mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Genet.* 5, 487- 495, (1971)
- Mounolou, J. C.: Role d'un ADN spécifique dans le déterminisme génétique et physiologique des mitochondrie de la levure. Thèse de doctorat d'état ès- sciences naturelles, Paris, 1967
- Mounolou, J. C.; Jakob, H.; Slonimski, P. P.: Mitochondrial DNA from yeast "petite" mutants: specific changes of buoyant density corresponding to different cytoplasmic mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 218- 224, (1966)
- Moustacchi, E.; Williamson, D. H.: Physiological variation in satellite components of yeast DNA detected in density gradient centrifugation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23, 56- 61, (1966)
- Nagai, S.: Induction of respiration- deficient mutations in yeast by various synthetic dyes. *Science* 130, 1188- 1189, (1959)
- Nagley, P.; Linnane, A. W.: Mitochondrial DNA deficient petite mutants of yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39, 989- 996, (1970)
- Nagley, P.; Linnane, A. W.: Biogenesis of mitochondria XXI. Studies on the nature of the mitochondrial genome in yeast: the degenerative effects of ethidium bromide on mitochondrial genetic information in a respiratory competent strain. *J. Molec. Biol.* 66, 181- 193, (1972)

- Nordström, K.: Induction of the petite mutation in *Saccharomyces cerevisiae* by N- methyl- N'- nitro- N- nitroso- guanidine. *J. Gen. Microbiol.* 48, 277- 281, (1967)
- Pittman, D.: Ultraviolet induction of respiratory deficient variants of *Saccharomyces* and their stability during vegetative growth. *Cytologia (Tokyo)* 24, 315- 325, (1959)
- Rabinowitz, M.: Extranuclear DNA. *Bulletin de la société de chimie biologique* 50, 311- 348, (1968)
- Rank, G. H.: Genetic evidence for "Darwinian" selection at the molecular level. I. The effect of the suppressive factor on cytoplasmically- inherited erythromycin- resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Canad. J. Genet. Cytol.* 12, 129-136, (1970a)
- Rank, G. H.: Genetic evidence for "Darwinian" selection at the molecular level. II. Genetic analysis of cytoplasmically- inherited high and low suppressivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Canad. J. Genet. Cytol.* 12, 340 - 346, (1970b)
- Rank, G.H., Person, C.: Reversion of cytoplasmically- inherited respiratory deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Genet. Cytol.* 11, 716- 728 (1969)
- Raut, C.: Heritable nongenic changes induced in yeast by ultraviolet light. *J. Cellular Comp. Physiol.* 44, 463- 475, (1954)
- Slonimski, P. P.; Ephrussi, B.: Action de l'acriflavine sur les levures. V. Le système des cytochromes de mutants "petite colonie". *Ann. Inst. Pasteur* 77, 47- 63, (1949)
- Slonimski, P. P.; de Robichon- Szulmajster, H.: Specific polyhydroxy compounds as cofactors of enzymic adaptation and its inheritance. *Ciba Foundation Symposium. Drug resistance in microorganisms.* p. 210- 233, (1957)
- Werkheiser, D.: The induction of petite mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by ICR- 170 and their genetic characterization. M. S. Thesis, Illinois State University, Normal, 1971.

- Workheiser, D. Pittman, D.: Induction of petite mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by ICR- 170 and their genetic characterization. *Genetics* 72, 177- 182, (1972)
- Whittaker, P. A.: A model for the "petite" mutation in yeasts. *Microbios* 1, 195- 197, (1969)
- Wilkie, D.: The induction by monochromatic u. v. light of respiratory- deficient mutants in aerobic and anaerobic cultures of yeast. *J. Molec. Biol.* 7, 527- 533, (1963)

IV. Anreicherungsmethoden für atmungsdefekte Mutanten

Im vorhergehenden Abschnitt wurde beschrieben, daß es sich bei den untersuchten Mutanten mit größter Sicherheit um solche handelt, deren primäre Mutation im Kerngenom lokalisiert ist, ohne daß man eine zusätzliche Mutation in der Mitochondrien-DNS vollständig ausschließen könnte. Wie schon aus den Untersuchungen Bulders hervorgeht, sind atmungsdefekte Mutanten bei Schizosaccharomyces pombe selten. (Dies gilt auch für die genisch atmungsdefekten Mutanten von Saccharomyces cerevisiae). Es wurden deshalb Methoden entwickelt, welche atmungsdefekte Mutanten anreichern. Zum Teil wurden sie aus bekannten Methoden zur Anreicherung auxotropher Mutanten abgeleitet.

IV. 1) Anreicherung durch Abtötung wachsender Zellen

Schon seit langem wurden in der Bakteriengenetik Selektionsverfahren benutzt, bei denen in einem Minimalmedium wachsende Zellen durch Antibiotica gehemmt oder abgetötet und damit die nicht wachsenden auxotrophen Mutanten angereichert werden (Adelberg, 1953; Davis, 1950). Auch bei Saccharomyces cerevisiae wurden durch Zugabe des Antibiotikums Nystatin auxotrophe Mutanten selektiv angereichert (Moat und Peters, 1959; Snow, 1966; Thouvenot und Bourgeois, 1971). Ein anderer Weg der Selektion wurde für Schizosaccharomyces pombe beschritten.

IV. 1. 1) Der mesoinositollose Tod

Einige Stämme von Saccharomyces cerevisiae sind mesoinositabhängig, während Schizosaccharomyces - Stämme obligat meso-

inositbedürftig sind (de Robichon- Szulmajster, 1956). Bei inositolabhängigen Stämmen erzeugt Mesoinositmangel eine dem Crabtree- Effekt (= starke Unterdrückung der respiratorischen Stoffwechselwege in Gegenwart von Glucose: de Deken, 1966; Duntze et al., 1967; Knöpfel, 1972; von Meyenburg, 1969) ähnliche Wirkung (Gosh et al., 1960; Gosh und Bhattacharyya, 1967). Es entstehen abnorme Zellen mit wesentlich mehr Glucan als normal, wobei sich die Tochterzellen nicht mehr abtrennen können. In einem mesoinositfreien Medium teilen sich Zellen von Schizosaccharomyces pombe 1 - 2 mal und gehen dann wegen ihrer durch Mesoinositmangel defekten Zellwand zugrunde. Auxotrophe Zellen hingegen, welche in Minimalmedium nicht zu wachsen vermögen, können so selektiv angereichert werden. Zur Selektion atemungsdefekter Mutanten wurden UV- bestrahlte und zwischenbebrütete Zellen mit einer Dichte von $10^6 - 10^7$ Zellen/Platte auf mesoinositolfreies Minimalmedium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle plattiert. Dabei gehen die wachsenden atemungskompetenten Zellen zugrunde und die atemungsdefekten Zellen können dann nach Zugabe von Mesoinositol und Glucose zu Kolonien heranwachsen. Auf diesem Wege wurden die Mutanten pet 137 - 161 gewonnen (siehe Tabellen 9 und 10). Mit dieser Methode können keine leaky- Mutanten, also solche mit geringerer Wachstumsgeschwindigkeit auf Glycerinmedium, selektiert werden.

IV. 1. 2) Die 2- Deoxyglucose- Methode

Eine andere Möglichkeit der Anreicherung ist durch die Anwendung des toxischen Zuckers 2- Deoxyglucose gegeben. Saccharomyces wächst in Gegenwart dieses Zuckers, wobei die 2- Deoxy-

glucose in das Mannan der Zellwand eingebaut wird (Diely et al., 1972). Schizosaccharomyces wächst in Gegenwart von Deoxyglucose anfangs normal, dann aber beginnen die Zellen zu lysieren (Megnet, 1965a). Megnet selektierte mit dieser Methode hexokinase- defekte und allgemein auxotrophe Mutanten bei Schizosaccharomyces pombe (Megnet, 1965a^b). Das Verfahren wurde wie in "Methoden" beschrieben zur Isolierung atmungsdefekter Mutanten abgewandelt. Auf diese Weise wurden die Mutanten pet 101 - 119 gewonnen.

IV. 2) Anreicherung atmungsdefekter Mutanten durch Triphenyl- tetrazolium- chlorid (TTC)

Durch Lederbergs (1948) Entdeckung fermentativer Varianten bei Bakterien mit Tetrazolium aufmerksam gemacht, beobachtete Raut (1954), daß atmungsdefekte Mutanten von Saccharomyces auf TTC- haltigem Medium als weiße Kolonien zu wachsen vermögen, während sich Wildtypkolonien rosa anfärben. Brock (1958) und Zsolt (1960) fanden, daß TTC, direkt in den Agar gegeben, das Wachstum atmender Hefezellen blockiert. Wilson (1967) beobachtete auch bei Neurospora crassa eine Anreicherung der poky- Mutante auf TTC- haltigem Medium. Von der Methode, atmungsdefekte Mutanten bei Hefe mittels TTC-haltigem Mediums zu isolieren, wurde jedoch kaum Gebrauch gemacht, da Laskowski (1954) publizierte, daß TTC in bestimmten Konzentrationen extrachromosomale petites erzeugt. Die meisten Autoren verwendeten daher weiterhin TTC nur als diagnostisches Mittel in Form von overlay- Agar (Nagai, 1955; Ogur et al., 1954;

Ogur und St. John, 1956; Ogur et al., 1957, 1959).

IV. 2. 1) Selektive Wachstumshemmung bei *Saccharomyces cerevisiae*

(Im folgenden werden teilweise auch Versuchsergebnisse von V. Bachofen (1970) erwähnt, die zur logischen Fortführung der Darstellung nötig sind.)

Um die selektive Wirkung von TTC an einer definierten atemungsdefekten Mutante zu untersuchen, wurde einer ρ^- Mutante von *Saccharomyces cerevisiae* und ihr zugehöriger Wildtyp gewählt. Ein Gemisch des Wildtypstammes M 12 und eines durch Ethidiumbromidbehandlung von ihm abgeleiteten petite- Stammes wurde auf Hefeextrakt- Pepton- Medium mit 2 % Glucose und steigenden Konzentrationen von TTC plattiert. Das Ergebnis ist als Zeichnung nach Fotografien in Fig. 22 dargestellt. Die Kontrollplatte zeigt die großen atemungskompetenten und die kleineren atemungsdefekten Kolonien in etwa gleicher Anzahl. Während 25 μg TTC/ml noch ohne Wirkung auf das Wachstum des Wildtyps ist, ergeben 50 und 100 μg bereits deutliche Hemmung des Wildtyps, während die Größe der petite-Kolonien unbeeinflusst bleibt.

Werden 10^4 Zellen einer Flüssigkultur des Stammes M 12 auf Glucosemedium mit 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TTC plattiert, so beobachtet man 3 Typen von Kolonien:

- 1.) 5 - 6 Kolonien von normaler Größe, welche sich als Atemungsdefekte des ρ^- Typs erweisen,
- 2.) etwa 20 - 40 kaum sichtbare, dunkelrote atemungskompetente Mikrokolonien,
- 3.) einige mittelgroße atemungskompetente Kolonien.

Ein ähnliches Ergebnis zeigt ein Experiment mit dem Stamm A 1327 A,

der eine hohe Spontanrate zu Atmungsdefizienz zeigt. Das Ergebnis dieses analogen Experiments ist in Tab. 4 dargestellt.

IV. 2. 2) Selektive Wachstumshemmung bei Schizosaccharomyces

Für die Selektion atmungsdefekter Mutanten bei Schizosaccharomyces erweisen sich niedrigere TTC- Konzentrationen als optimal. Plattiert man Zellen des Wildtypstammes 972h⁻ auf Hefeextraktmedium mit 2 % Glucose und 30 mg/l TTC, so erscheinen auch hier Kolonien der 3 bei Saccharomyces gefundenen Typen. Die Gruppe der sehr kleinen dunkelroten Kolonien wurde auf Glycerinmedium getestet und es ergab sich ähnlich wie bei Saccharomyces, daß die Mehrzahl der Kolonien atmungskompetent war. Einige dieser dunkelroten Kolonien (pet 421, pet 422) sind trotz ihrer Fähigkeit, TTC zu reduzieren, atmungsdefekt. Mehrere Kolonien des Typs 3 wurden ebenfalls untersucht, wobei sich etwa die Hälfte als atmungsdefekt erwies (pet 404, 411, 412, 413, 415, 418, 420, 423, 424, 426, 427). Atmungskompetente Kolonien der Typen 2 und 3, welche auf TTC zu wachsen vermögen, werden später besprochen.

Eine Anreicherung von atmungsdefekten Mutanten ist auch in Flüssigkultur möglich, doch ist sie hier stark von den Zuchtbedingungen abhängig. Eine Mischung von 95 % des atmungskompetenten Stammes 50h⁻ ade 7 und 5 % einer atmungsdefekten Mutante (h⁻ADE7) wurde unter folgenden Bedingungen in Hefeextraktmedium gezogen:

- 1.) mit 0,5 % Glucose und verschiedenen TTC- Konzentrationen
in statischer Kultur;
- 2.) wie 1.), jedoch mit 10 % Glucose;
- 3.) wie 1.), jedoch unter starker Belüftung.

Bei den optimalen TTC-Konzentrationen stieg der Anteil RD-Zellen von 5 auf 75 %; sowohl hohe Glucosekonzentrationen als auch starke Belüftung heben die selektierende Wirkung nahezu auf. Die Ergebnisse sind in Fig. 23 dargestellt (Experiment aus Bachofen, 1970).

IV. 2. 3) Charakterisierung der TTC-selektierten Mutanten

Bei Saccharomyces werden durch TTC sowohl extrakaryotische als auch karyotische Atmungsdefekte angereichert. Dies wurde an den Mutanten pet 6 und pet 7 nachgewiesen (Sherman und Slonimski, 1964). Wie in Abschnitt III bereits dargestellt wurde, sind alle bisher getesteten Schizosaccharomyces-petites sehr wahrscheinlich karyotisch. Eine biochemische Charakterisierung (ausführlich im Kapitel VI) zeigt, daß TTC-selektierte Mutanten bei Schizosaccharomyces pombe Defekte in allen Teilen der Atmungskette tragen können (Komplex I - IV). Die durch verschiedene Mutagene induzierten und durch TTC selektierten Mutanten sind in Tab. 9 aufgeführt.

IV. 2. 4) Resistenzmutanten von Schizosaccharomyces gegen TTC

Zwei Resistenzmutanten, welche auf TTC kleine rote Kolonien bilden (BR: R bedeutet rot auf TTC, r dagegen rosa auf TTC) und 4 des Typs, welcher auf TTC rosa Kolonien bildet (Br) wurden mit dem TTC-sensiblen Stamm 50h⁻ ade 7 rückgekreuzt. Mit Hilfe der Freisporanalyse wurde die Aufspaltung der Auxotrophie sowie des Resistenzmarkers geprüft. (TTC-Konzentration: 30 mg/l) Die Kolonien wurden nicht direkt auf TTC abgestempelt, sondern erst auf eine andere Platte abgedrückt. Bringt man nämlich zu

viele Zellen des sensiblen Stammes auf TTC- haltiges Medium, dann nehmen die Zellen so viel TTC aus dem Medium auf, daß ein Teil der Sensiblen zu wachsen vermag. Für alle untersuchten Resistenzmutanten ergab sich eine klare 1 : 1- Aufspaltung für Auxotrophie und Resistenz bzw. Sensibilität (Tab. 6). Die beiden TTC- Resistenzen sind also höchstwahrscheinlich karyotisch vererbt. Die biochemischen Daten dieser Mutanten (Tab. 5) werden im Zusammenhang mit den atmungsdefekten Mutanten besprochen.

IV. 3) Anreicherung atmungsdefekter Mutanten durch Cobaltsulfat
Acriflavin bewirkt F- Eliminierung in F^+ - Zellen von Escherichia coli und Verlust des rho- Faktors bei Saccharomyces cerevisiae (Hirota, 1956, 1960). Cobaltsalze wirken ebenfalls F- eliminierend bei E. coli. Die Annahme, daß der bakterielle F- Faktor und der rho- Faktor bei Saccharomyces gemeinsame Eigenschaften besitzen könnten (Nass, 1969) führten Horn und Wilkie (1960) zu ihren Untersuchungen über die Wirkung von Cobalt auf Saccharomyces und dessen atmungsdefekte Mutanten. Die Autoren fanden, daß die extrakaryotische petite-Mutante von Saccharomyces etwa dreimal resistenter gegen Cobalt war als der atmungskompetente Wildtyp. Atmungsdefekte kernkodierte Mutanten schienen diese Resistenz nicht zu besitzen. Cobalt erschien damit als das geeignete Agens, um bei Schizosaccharomyces nach cytoplasmatisch vererbten petites zu selektieren.

Nach Nitrosoguanidinmutagenese und Zwischenbebrütung wurden etwa 10^5 - 10^7 Zellen pro Platte auf Hefeextrakt-Medium mit 3 % Glucose und 1,5 mM bzw. 2,0 mM CoSO_4 plattiert.

Nach viertägiger Debrütung bei 30° C wurden die größten Kolonien abisoliert; die meisten Isolate erwiesen sich als atemungsdefekt. Die Mutanten pet 350 - pet 368 wurden mit 2 mM CoSO₄, die Mutanten pet 368 - pet 400 mit 1,5 mM CoSO₄ selektiert.

IV. 3. 1) Cobalttoleranz TTC- selektierter atemungsdefekter Mutanten

Da es sich bei den bisher untersuchten atemungsdefekten Mutanten von Schizosaccharomyces pombe durchwegs um karyotische Mutanten handelt, muß die Frage gestellt werden: Ist die Cobaltresistenz bei Schizosaccharomyces pombe eine Eigenschaft aller RD- Mutanten oder nur einer bestimmten Gruppe? Um diese Frage zu beantworten, wurde eine Reihe TTC- selektierter Mutanten auf ihre Cobaltresistenz geprüft. Die Mutanten pet 4 (UV 1), pet 5 (UV 2), pet 12 (UV 9), pet 19 (UV 16), pet 20 (UV 17), pet 29 (UV 26), pet 31 (UV 28), pet 32 (UV 29), pet 33 (UV 30), pet 39 (UV 36), pet 69 (UV 67), pet 71 (UV 70), pet 100 (UV 119), pet 153 (UV 203) und pet 161 (UV 213) wurden auf Hefeextraktmedium mit 2 % Glucose und steigenden Konzentrationen CoSO₄ (0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0 mM) plattiert und mit dem Wildtyp verglichen. Dabei zeigte sich, daß nur die Mutante pet 5 (UV 2) resistent gegen CoSO₄ war. Fig. 17 zeigt das Wachstum eines Gemischs dieser Mutante mit dem Wildtyp auf Medium mit 1,25 mM CoSO₄ und einer Kontrollplatte. Bei dieser Cobaltkonzentration ist der Wildtyp stark gehemmt, auf der Kontrollplatte jedoch von gleicher Koloniegröße wie die Mutante. Die Ergebnisse eines analogen Versuchs mit Cobaltkonzentrationen von 0 - 3 mM sind in Tab. 7 zusammengefaßt. Ab 1,5 mM CoSO₄ wird auch die Mutante gehemmt, bei 2,5 mM zeigt sich kein Wachstum mehr.

IV. 3. 2) Die anreichernde Wirkung von CoSO_4 in Flüssigkultur
Die Anreicherung atmungsdefekter Mutanten mit TTC in Flüssigkultur wies eine starke Abhängigkeit von den Zuchtbedingungen auf. Im folgenden soll deshalb die Abhängigkeit des Wachstums von Wildtyp und pet 5 (UV 2) von Glucosekonzentration, Cobaltkonzentration und Belüftung untersucht werden. Alle Vorkulturen wurden unter gleichen Bedingungen angezogen; die Zellen für einen Versuchsansatz stammen aus ein und derselben Vorkultur. Fig. 26 zeigt das Wachstum von Wildtyp 972h⁻ und pet 5 in statischer Kultur mit 0,1 und 2 mM CoSO_4 . Die Generationsdauer der Mutante ist etwas größer als die des Wildtyps, der erreichte Endtiter etwas niedriger. 1 mM CoSO_4 hat kaum Einfluß auf Wachstumsgeschwindigkeit von Wildtyp und pet 5. Mit 2 mM CoSO_4 wächst pet 5 nur etwas langsamer und erreicht fast den Endtiter der Kontrolle, wogegen der Wildtyp stark gehemmt ist. Bei den in Fig. 27 - 29 dargestellten Versuchen handelt es sich um langsam geschüttelte Reagenzglaskulturen (etwa 25 Oszillationen/Min.). Steigende Cobaltkonzentrationen (0; 1; 1,5; 2 mM) hemmen pet 5 wenig und fast bei allen Konzentrationen wird der Endtiter der Kontrolle erreicht. Deutlich, wenn auch nicht so ausgeprägt wie in statischer Kultur, ist der Hemmeffekt am Wildtyp. Während 1 mM CoSO_4 nicht stärker hemmt als bei der Mutante, ist das Wachstum durch die höheren Co- Konzentrationen stark gehemmt. Die Hemmwirkung von CoSO_4 steigt bei Mutante und Wildtyp mit Erhöhung der Glucosekonzentration; eine Aufhebung der selektierenden Wirkung wie bei TTC- Selektion konnte nicht beobachtet werden.

IV. 3. 3) Einfluß von Cobalt auf op_1 , eine genische Mutante der oxidativen Phosphorylierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Cytoplasmatische petites sind resistent gegen Cobalt, wohingegen nur wenige genisch bedingte Atmungsdefekte diese Resistenz zeigen. Daraus geht eindeutig hervor, daß es nicht die Atmung an sich sein kann, deren Defizienz Cobaltresistenz bewirkt. Beide, cytoplasmatische und genische petites können gleichermaßen Defekte der oxidativen Phosphorylierung aufweisen. Um zu prüfen, ob diese defekte oxidative Phosphorylierung für die Cobaltresistenz verantwortlich ist, wurde die Wachstums- und Hemmung der genischen Mutante op_1 mit defekter Phosphorylierung durch Cobalt untersucht. Dabei zeigte sich (Fig. 30), daß op_1 ebenso gehemmt wird wie der Wildtyp (vergl. Fig. 37), also eine defekte Phosphorylierung nicht für die Cobalt-Resistenz verantwortlich ist.

IV. 3. 4) Wirkung von Cobalt nach Blockierung der Atmung mit Antimycin A (AA)

Ein weiterer Beweis, daß die primäre Ursache nicht in der Atmung selbst liegt, kann dadurch erbracht werden, wenn man in Kulturen von Wildtyp und op_1 die Atmung durch AA ($1 \mu\text{g/ml}$) hemmt. Wäre die Atmung für die Sensitivität gegen Cobalt verantwortlich, so müßten Kulturen mit Cobalt und AA einen Wachstumsvorteil vor denen mit Cobalt ohne AA haben. Ein solcher Vorteil zeigte sich jedoch weder beim Wildtyp noch bei op_1 .

IV. 3. 5) Wirkung von Cobalt auf die Cytochrome der Atmungskette

Um zu untersuchen, ob die Atmungskette überhaupt in irgendeiner Weise durch das Wachstum in cobalthaltigem Medium beeinflusst wird, wurde *Saccharomyces cerevisiae* Stamm M 12 in steigenden

Cobaltkonzentrationen gezogen (0 - 2 mM). Die Versuche wurden mit verschiedenen Kohlenstoffquellen ausgeführt (je 3.5) : mit Glucose (vergärbar, reprimierend), mit Galactose (vergärbar, schwach reprimierend) und mit Glycerin (nicht vergärbar, nicht reprimierend). (Zur Glucoserepression der Atmungsenzyme siehe Beck und Meyenburg, 1968) Die Kulturen wurden mit etwa 10^6 Zellen/ml angeimpft und bis in die stationäre Phase (Glucosekonzentration = 0) bebrütet. Die Zellen wurden in hoher Dichte in 50 %igem Glycerin aufgenommen und von jeder Kultur ein Differenzspektrum (dithionitreduziert) aufgenommen. Fig. 32 zeigt die Differenzspektren der glucosegezogenen, Fig. 33 die der galactosegezogenen und Fig. 34 die der glyceringezogenen Kulturen. Unter allen drei Zuchtbedingungen zeigt sich, daß bereits ab 0,2 mM CoSO_4 Cytochrom aa_3 stark vermindert erscheint, während Cytochrom b im Vergleich zu Cytochrom c erhöht erscheint. Mit zunehmender Cobaltkonzentration verschwindet der Cytochrom aa_3 -peak (600 nm) fast gänzlich. Derselbe Effekt zeigt sich für isolierte Mitochondrien aus glucosegezogenen Zellen (Fig. 35). Wie Kontrollversuche zeigen, handelt es sich hier auch nicht um Überlagerung mit dem Spektrum von CoSO_4 (Fig. 35 unten). Das Spektrum von cytoplasmatischen petites ist durch Co nicht beeinflusst. Die Ergebnisse beweisen, daß unter Einfluß von Co Veränderungen der Atmungsenzyme auftreten, die jedoch die Atmungsfähigkeit nicht merklich beeinträchtigen.

IV. 3. 6) Veränderungen der mitochondrialen DNS und ihre Auswirkungen auf die Cobaltresistenz

Aus der Sensitivität von kernkodierten atmungsdefekten Mutanten und der Resistenz cytoplasmatischer petites gegen Cobalt schließen

Horn und Wilkie, daß die Cobaltsensitivität von der Intaktheit der mitochondrialen DNS abhängt. Die tiefgreifendste Veränderung der Mitochondrien- DNS stellt der Typ der ρ^- - Mutation dar, wobei entweder die ganze DNS verloren geht (ρ^0) oder große Deletionen gesetzt werden, welche durch bekannte oder neue Sequenzen aufgefüllt werden (Borst, 1972).

Im Folgenden soll geprüft werden, ob Deletionen oder auch Punktmutationen in der Mitochondrien- DNS eine Erhöhung der Cobaltresistenz herbeiführen können. Die Lage der untersuchten Punktmutationen zur Chloramphenicol- Resistenz (C), Erythromycinresistenz (E), Oligomycinresistenz (O) und Paromomycinresistenz (P) und ihre funktionelle Zuordnung sind in Fig. 31 dargestellt. Die 8 Diploiden sind das Ergebnis folgender Kreuzung mit anschließender mitotischer Segregation:
 $M\ 12/54\ \omega^- \ C^S E^S O^S P^R_{454} \times IL\ 70-7A\ \omega^- \ C^S E^R_{221} O^R_1$
Alle daraus hervorgegangenen Diploiden sind isochromosomal. Da sich sämtliche Diploiden, wie in Fig. 36 gezeigt, in ihrem Wachstumsverhalten in cobalthaltigem Medium nicht unterscheiden, kann man schließen, daß die verwendeten mitochondrialen Punktmutationen keinen Einfluß auf die Cobaltresistenz besitzen.

IV. 3. 7) Stammspezifität der Cobaltresistenz

Um den Einfluß des Kerngenoms auf die Resistenz gegen Cobalt zu untersuchen, wurde das Wachstumsverhalten verschiedener Stämme von Saccharomyces cerevisiae untersucht. Aufgrund ihrer Entstehung sind alle Stämme mit Ausnahme von M 12 und der aus ihm abgeleiteten Mutante M 12/54 chromosomal heterogen. Die Wachstumscharakteristika in verschiedenen Cobaltkonzentrationen (0, 1 und 2 mM) sind in Fig. 37 dargestellt. Die zwei Stämme

mit gleichem Kerngenom (M 12 und M 12/54) verhalten sich gleich, während sich die übrigen Stämme teils stark voneinander unterscheiden. Zwei Gruppen sollten hier besonders hervorgehoben werden:

- 1.) Eine Gruppe, welche kaum von 1 mM CoSO_4 gehemmt wird (IL 166- 4 B; IL 125- 2 D; IL 216 - 1 D) und
- 2.) eine Gruppe, welche bereits durch 1 mM CoSO_4 stark gehemmt wird (55R5 - 3 C; IL 8-4 C; IL 781-4 D; IL 779- 2 B)

Die Sensitivität gegenüber Cobalt ist also stark stammspezifisch.

IV. 3. 8) Cobaltresistenz verschiedener petites

Wie wir aus den vorhergehenden Abschnitten ersehen konnten, führen Punktmutationen im mitochondrialen Genom nicht zu Erhöhung der Cobaltresistenz, wohl aber Deletionen. Da man weiß, daß bei der ρ^- - Mutation verschiedene Regionen der mitochondrialen DNS verloren gehen können, sollte es möglich sein, petites zu finden, welche sich in ihrer Cobaltresistenz unterscheiden, je nachdem, welche Region von der Deletion betroffen ist. Durch Ethidiumbromidmutagenese wurden petites mit verschiedenen Deletionen erzeugt, deren unterschiedlicher Genotyp im Replica- cross- Verfahren (Fig. 38) geprüft und ihr mitochondriales Genom stabilisiert wurden. Die Stabilität der petites (Prozentsatz der Zellen, welche bestimmte mitochondriale Marker tragen) ist in Tab. 19 angegeben. Das Wachstumsverhalten von 8 petites in Co- haltigen Medien wurde geprüft und die Ergebnisse in Fig. 39 dargestellt. Alle petites zeigen im Kontrollexperiment ohne Cobalt gleiches Wachstumsverhalten und kaum gehemmtes Wachstum in 1 mM CoSO_4 . Die petites E4/1; 614/2; D6/1 und R5/3 sind alle im Stamm IL 8- 3 C induziert und damit direkt vergleichbar.

R5/3 wird durch 2 mM CoSO_4 wesentlich stärker gehemmt. Da sich der Stamm jedoch nur durch sein mitochondriales Genom von den anderen unterscheidet, kann man daraus schließen, daß seine Cobaltresistenz höchstwahrscheinlich von der Art der Deletion des mitochondrialen Genoms abhängt. Starke Sensibilität gegen Cobalt zeigt die petite IL 828-4B/271/41/1, bei der die O_1 -Region erhalten ist; sie wird ebenso stark gehemmt wie ihr Wildtyp (Fig. 37). Um die Cobaltresistenz jedoch dem Ausfall einer bestimmten Genregion zuordnen zu können, müßten mehr petites untersucht werden.

IV. 3. 9) Resistenzmutanten gegen CoSO_4 bei Schizosaccharomyces

Wie bei TTC, so wurden auch hier atungskompetente Mutanten gefunden, welche resistent gegen das selektierende Agens sind.

Zwei Typen der Resistenz können unterschieden werden:

a) Zellen, welche auf cobalthaltigem Medium weiß bleiben und deren Resistenz wahrscheinlich auf unterschiedlicher Permeabilität für Cobalt beruht.

b) Cremefarbene Zellen, welche trotz Aufnahme des Cobalts resistent sind.

Vier Vertreter der Klasse a) und 3 der Klasse b) wurden mit einem sensiblen Stamm zurückgekreuzt: die Ergebnisse (Tab. 8) zeigen, daß es sich in beiden Fällen um karyotisch vererbte Resistenzen handelt.

IV. 4) Zusammenfassung

1.) Die Methoden der selektiven Anreicherung von Auxetrophon durch Mesoinositmangel oder Deoxyglucose wurden für die Selektion atungsdefekter Mutanten adaptiert und Atungsdefekte bei Schizosaccharomyces pombe selektiert.

- 2.) Mit der TTC- Methode können auf festem und in flüssigem Medium sowohl karyotische als auch extrakaryotische Atmungsdefekte selektiert werden. Hohe Glucosekonzentrationen und starke Belüftung heben den Selektionseffekt auf.
- 3.) TTC - selektierte Mutanten weisen Defekte in allen Komplexen der Atmungskette auf.
- 4.) Mutation zur TTC- Resistenz ist bei Schizosaccharomyces karyotisch vererbt.
- 5.) Atmungsdefekte Mutanten von Schizosaccharomyces können auf cobalthaltigem Medium selektiert werden.
- 6.) Unter mehreren TTC- selektierten Atmungsdefekten von Schizosaccharomyces erwies sich nur pet 5 als Co- resistent. Sie ist in Flüssigkultur resistenter als der Wildtyp, wobei eine Aufhebung des selektiven Effektes wie bei TTC durch 10 % Glucose nicht beobachtet wurde.
- 7.) CoSO_4 bewirkt Veränderungen des Cytochromspektrums.
- 8.) Die chromosomale Mutante op_1 von Saccharomyces wird ebenfalls durch Co gehemmt.
- 9.) Mitochondriale Punktmutationen sind ohne Einfluß auf die Cobaltresistenz.
- 10.) Die Cobaltresistenz ist stammspezifisch.
- 11.) Petites mit unterschiedlichen mitochondrialen Deletionen und gleichem Kerngenom zeigen unterschiedlichen Grad der Cobaltresistenz.
- 12.) Zwei Typen der Cobaltresistenz bei Schizosaccharomyces sind karyotisch vererbt.

IV. 5) Diskussion

IV. 5. 1) Die TTC- Methode

Die TTC- Methode ist der Mesoinosit- und Deoxyglucose- Methode dadurch überlegen, daß mit Ausnahme der wenigen TTC- Resisten- ten ausschließlich atmungsdefekte und nicht auch auxotrophe Mutanten angereichert werden. Diese Methode wurde wohl zu Un- recht wegen der angeblich induzierenden Wirkung von TTC zu gunsten anderer Methoden aufgegeben. Bachofen (1970), Bachofen et al. (1972) und Smidt (1973) konnten jedoch zeigen, daß für die von ihnen verwendeten Stämme von Saccharomyces und Schizo- saccharomyces und das verwendete Präparat keine petite- indu- zierende Wirkung nachgewiesen werden kann.

Die Selektion von RD- Mutanten mittels TTC ist eine Methode, welche auf der Fähigkeit, bzw. Unfähigkeit der Zelle beruht, zu atmen und dadurch TTC zum unlöslichen For- mazan zu reduzieren (Fig. 25). Das zeigt sich daran, daß die Selektion nur dann wirkt, wenn die Glucosekonzentration im Me- dium niedrig ist. Die Bildung der Atmungsenzyme wird jedoch bei höheren Glucosekonzentrationen weitgehend reprimiert (Beck und Meyenburg, 1969; de Deken, 1966; Duntze, 1967; Meyenburg, 1969) und die Atmung setzt erst wenige Generationen vor der stationä- ren Phase voll ein (Slonimski, 1953ab, 1956, 1962). Bei hohen Glucosekonzentrationen wird die stationäre Phase vor dem Auf- brauchen des Zuckers erreicht, weshalb keine Selektion statt- findet. Die besten selektiven Bedingungen erhält man auf festem Medium. Hier wirkt der Selektionsmechanismus auch bei höheren Glucosekonzentrationen dadurch, daß wegen zu geringer Diffusion die Glucosekonzentration lokal um die Kolonie rasch sinkt und die Dereprimierung der Atmung noch vor dem Erscheinen der Wild- typkolonien einsetzt.

Welches nun der mögliche Angriffspunkt für TTC an der Atmungskette ist, läßt sich sowohl durch biochemische als auch durch genetische Untersuchungen belegen. Wie Bachofen (1970) zeigen konnte, hemmt Belüftung die anreichernde Wirkung des Agens, wofür eine Konkurrenz des TTC mit dem Sauerstoff in der Übernahme der Elektronen von der Endoxydase der Atmungskette verantwortlich gemacht werden kann. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen, welche Slater et al. (1963) an Rattenleber-Mitochondrien erhielten. Die Formazanbildung im Succinat-TTC- Reduktase- Test konnte durch kräftige Belüftung des Inkubationsgemischs gehemmt und die Reaktion durch Cyanid blockiert werden. Zum gleichen Ergebnis bezüglich der Angriffsstelle von TTC kamen auch Nachlas et al. (1960) an Rattenleber. Von seinem niedrigen Elektronenpotential von +460mV her ist TTC als Elektronenakzeptor anstelle des Sauerstoffs geeignet (Fig. 24). Der wohl beste Beweis für die Angriffsstelle von TTC ist der genetische. Unter der großen Zahl TTC-selektierter Mutanten (Tab. 10) sind zahlreiche mit defekter Endoxydase, deren Elektronentransport bis zur Oxidase funktionsfähig ist. Dies aber läßt sich nur dann erklären, wenn man voraussetzt, daß TTC die Elektronen von der Endoxydase abnimmt. Griffe TTC an anderer Stelle an, so würden die Elektronen bis zum TTC gelangen, dieses würde zum Formazan reduziert und die Mutante würde wie der Wildtyp gehemmt. Da TTC offenbar erst nach der Endoxydase angreift, können mit diesem Agens alle biochemisch möglichen atmungsdefekten Mutanten angereichert werden. Daß es sich bei dem Selektionsvorgang nicht um eine Abtötung, sondern um eine Hemmung handelt, konnte Bachofen (1970) nach-

weisen. Was nun das gebildete Formazan in der Zelle bewirkt und welcher Art die Resistenz gegen TTC ist, konnte nicht geklärt werden. Als Möglichkeiten waren eine allgemeine Stoffwechselbehinderung durch das unlösliche Formazan oder eine pH-Verschiebung durch freigesetzte Cl^- -Ionen zu nennen. Entkoppelnde Wirkung des TTC, wie sie von Clark et al. (1965) und Sato und Sato (1965) an Rattenlebermitochondrien gefunden wurde, kann nicht ausgeschlossen werden. Eine instabile Form der TTC-Resistenz wurde von Colson et al. (1972) beschrieben. Die Autoren isolierten bei 10°C gewachsene atungskompetente Mutanten, welche bei 15°C sensibel, bei 25°C resistent gegen TTC waren. Nach 5 Tagen Inkubation bei der höheren Temperatur erschienen auf TTC atungsdefekte Kolonien mit einer Frequenz von 10^{-2} - 10^{-3} . Ob es sich hierbei um einen Effekt der petite-Induktion durch Kombination von TTC und höherer Temperatur handelt, wurde nicht geklärt.

IV. 5. 2) Die Cobaltmethode

Für die Selektion atungsdefekter Mutanten durch Cobalt ist ein Mechanismus verantwortlich, der mit Sicherheit weder Atmung noch oxidative Phosphorylierung ist, da nach Horn und Wilkie kernkodierte atungsdefekte Mutanten von Saccharomyces und bei Schizosaccharomyces auch die Mehrzahl der Mutanten keine Resistenz gegen Cobalt zeigen. Daß Cobalt in den Prozeß der Atmung eingreifen kann, beweisen Untersuchungen, bei dem das Eisen des Häm von Hämoglobin und Myoglobin durch Cobalt ersetzt werden konnte (Spilburg et al., 1972 ab; Hoffman et al., 1971; Schulman, 1970). Sone (1971 zeigte, daß Cobalt in ein Coproporphyrin bei Propionibacterium arabinosum eingebaut werden kann und dort die Funktion des Eisens übernimmt. Besonders gut ist die Lactat-

Dehydrogenase bei Hefe untersucht, bei der nach Ersatz des Zinks durch Cobalt ein aktives Enzym gebildet wird (Singer et al., 1960; Gregolin und Singer, 1961; Curdel und Labeyrie, 1961; Curdel, 1966). Ähnliches Verhalten gegenüber Cobalt zeigen Leber- Alkoholdehydrogenase (Drum, 1970), Hefe- Alkoholdehydrogenase (Curdel und Iwatsubo, 1968; Iwatsubo und Curdel, 1967), die Oxalacetattranscarbamylase aus Propionibacterium (Wood, 1967), eine Carboxypeptidase (Latt und Vallee, 1969) und die alkalische Phosphatase bei E. coli (Simpson und Vallee, 1968). Die spektralen Befunde nach Wachstum von Saccharomyces cerevisiae Stamm M 12 in Medien mit Glucose, Galactose und Glycerin lassen die Vermutung zu, daß eventuell ein Einbau von Cobalt in die Atmungskettenenzyme die spektralen Eigenschaften einiger Cytochrome, nicht aber die Funktionsfähigkeit der Atmungskette beeinflusst. Horn und Wilkie finden nämlich keinen hemmenden Einfluß von 2,5 mM Co auf die Sauerstoffaufnahme glyceringezogener Zellen während 5 Stunden, was aber nicht in Widerspruch mit den spektralen Befunden stehen muß, da die Synthese veränderter Cytochrome ein längerer Prozeß ist. Einen weiteren Beweis dafür, daß der Verlust der Atmung nicht für die Co- Resistenz verantwortlich ist, erbringen Horn und Wilkie dadurch, daß sowohl unter anaeroben als auch unter aeroben Bedingungen auf Medien mit 2; 2,5 und 3 mM Co immer gleich viel Zellen überleben, welche alle atmungsdefekt sind. Wohl aber besteht die Annahme, daß die hemmende Wirkung bei Schizosaccharomyces etwas mit der Glycerinaufnahme zu tun hat, da 100 mg/l CoSO_4 in Glucosemedium die Atmung nur um 6 %, in Glycerinmedium jedoch um 82 % hemmen. Die hemmende Wirkung von Cobalt in den angewandten Größenord-

nungen ist jedoch keine absolute. So erreicht Schizosaccharomyces 972 h⁻ in Flüssigkultur schließlich nahezu den Endtiter der Kontrollkultur. Einen ähnlichen Effekt der Adaptation berichtet Horn und Wilkie für Saccharomyces, der sich an 1,25 mM CoSO₄ zu adaptieren vermag.

Eine Selektion atmungsdefekter Mutanten kann also darauf beruhen, daß die Mutantenkolonien bereits die Glucose aufgebraucht haben, während sich der Wildtyp noch in der Adaptionsphase befand.

Worauf beruht nun aber der stark hemmende Effekt von Co, besonders bei Wachstum auf Glycerin? Allgemein wurde an mehreren Organismen gefunden, daß Metaboliten wie Aminosäuren, Purine und Porphyrine auch inaktiviert werden können, wenn sie mit Cobalt chelieren (Albert, 1960). Spritzt man Ratten Cobalt, so beobachtet man nach einiger Zeit eine drastische Hemmung der Atmung (Webb, 1962; Dingle et al., 1962). Ursache ist eine Komplexbildung von Cobalt (die Wirkung ist der des Arsenits ähnlich) mit der Dithiolform der Liponsäure, eines Coenzym der Ketosäuredehydrogenierung. Auch beim Menschen wurde der Hemmeffekt von Cobalt auf die Atmung beobachtet. Durch den Genuß cobalthaltigen Biers (Co als Schaumstabilisator) kam es zu Herzkrankheiten, welche ebenfalls auf die chelierende Wirkung von Cobalt auf die Dehydroliponsäure zurückzuführen sind, wodurch eine starke Anhäufung von Glycogen entsteht (Alexander, 1969). Eine weitere Wirkung von Cobalt wird durch Blundell und Wild (1969) beschrieben, bei der durch Einfluß des Agens die Proteinsynthese von E. coli bei gleichzeitiger Akkumulierung von RNS gestört war, was die Bildung äußerst instabiler Ribosomenvorläufer zur Folge

hatte.

Als wahrscheinlichster Wirkungsmechanismus werden von Horn und Wilkie und Heslot et al. (1970) die Entstehung einer DNS- Cobalt-Bindung angenommen, wie sie von Dove und Davidson (1962) beschrieben wurde. Zellen von ρ^- und ρ^+ - Stämmen, der Wildtyp und die pet 5-Mutante von Schizosaccharomyces sind permeabel für Cobalt. Dies läßt sich leicht an der Cremefarbe erkennen, welche einer Gruppe cobaltresistenter Mutanten fehlt. Wie die Versuche an petites zeigen, ist die Cobalttoleranz in petites gleichen Kerngenoms und verschiedenen mitochondrialen Genoms unterschiedlich. Dies bestärkt die Annahme Horn's und Wilkie's, daß die Hemmung durch Co von der Anwesenheit des ρ -Faktors abhängt. Da Cobalt auch von petites aufgenommen wird, muß entweder durch Adaptation oder durch eine nur in den petites vorhandene Struktur Cobalt entgiftet werden. Der Unterschied zwischen petites und grandes kann in einer unterschiedlichen Fähigkeit zur Entgiftung oder aber in einer unterschiedlichen Aufnahmerate des Agens beruhen. Es ist daher wahrscheinlich, daß eine Reihe verschiedener Faktoren für die Cobaltresistenz verantwortlich sind.

IV. c) Literaturverzeichnis zum Abschnitt "Ergebnisse IV"

- Adelberg, E. A.: Modification of the penicillin technique for the selection of auxotrophic bacteria. J. Bacteriol. 65, 348- 353, (1953)
- Albert, A.: Selective toxicity. Methuen, London. (1960)
- Alexander, C. S.: Cobalt beer cardiomyopathy. Federation Proceedings 28, I, Abstract 757, (1969)
- Bachofen, V.: 2, 3, 5- Triphenyl- Tetrazoliumchlorid als selektierendes Agens atmungsdefekter Mutanten von Saccharomyces cerevisiae und Schizosaccharomyces pombe. Diplomarbeit, München, 1970
- Bachofen, V.; Schweyen, R. J.; Wolf, K.; Kaudewitz, F.: Quantitative selection of respiratory deficient mutants in yeast by triphenyltetrazolium chloride. Zeitschrift für Naturforschung 27b, 252- 256, (1972)
- Beck, C.; Meyenburg, H. K. von: Enzyme pattern and aerobic growth of Saccharomyces cerevisiae under various degrees of glucose limitation. J. Bacteriol. 96, 479- 485, (1968)
- Biely, P.; Krátky, Z.; Bauer, S.: Metabolism of 2- deoxy- D- glucose by baker's yeast. IV. Incorporation of 2- deoxy- D- glucose into cell wall mannan. Biochim. Biophys. Acta 255, 631- 639, (1972)
- Blundell, M. R.; Wild, D. G.: Inhibition of bacterial growth by metal salts. The accumulation of ribonucleic acid during inhibition of E. coli by cobalt chloride. Biochem. J. 115, 213, (1969)
- Borst, P.: Mitochondrial nucleic acids. Annual Rev. of Biochem. 41, 333- 376, (1972)
- Brock, T. D.: Inhibition of growth of yeasts by 2, 3, 5- triphenyltetrazoliumchloride (TTC). Naturwissenschaften 45, 216, (1958)
- Clark, J. B.; Greenbaum, A. L.; Slater, T. F.: Effects of tetrazolium salts on oxidative phosphorylation in rat-liver mitochondria. Biochem. J. 94, 651- 654, (1965)

- Colson, A. M.; Colson, C.; Goffeau, A.: Altérations génétiques des membranes mitochondriales chez une levure petite négative. 4. Résistance au tetrazolium (TTC). Euratombericht, 321, (1972)
- Curdell, A.: Influence of the nature of the metallic prosthetic groups on the biosynthesis and enzymic properties of the D- lactic dehydrogenase in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 22, 357- 363, (1966)
- Curdell, A.; Iwatsubo, M.: Biosynthetic incorporation of cobalt into yeast alcohol dehydrogenase. FEBS Letters 1, 133- 136, (1968)
- Curdell, A.; Labeyrie, F.: D- Lacticodehydrogenase from anaerobic yeast. Combination of apoenzyme with zinc and cobalt and comparison of reconstituted enzymes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 4, 175, 179, (1961)
- Davis, B. D.: Studies on nutritionally deficient bacterial mutants isolated by means of penicillin. Experientia 6, 41- 50, (1950)
- de Deken, R. H.: The crabtree effect: a regulatory system in yeast. J. Gen. Microbiol. 44, 149- 156, (1966)
- Dingle, J. T.; Heath, J. C.; Webb, M.; Daniel, M.: The biological action of cobalt and other metals. II. The mechanism of the respiratory inhibition produced by cobalt in mammalian tissues. Biochim. Biophys. Acta 65, 34- 46, (1962)
- Dove, W. F.; Davidson, N.: Cation effects on the denaturation of DNA. J. Molec. Biol. 5, 467- 478, (1962)
- Drum, D.E.: Enzymatically and optically active cobalt and cadmium alcohol dehydrogenases. Federation Proceedings 29, I, Abstract 2031, (1970)
- Duntze, W.; Atzpodien, W.; Holzer, H.; Glucose- dependent enzyme activities in different yeast species. Arch. Mikrobiol. 58, 296- 301, (1967)
- Gosh, A.; Bhattacharyya, S. N.: Changes in the respiratory and glycolytic behaviour of *Saccharomyces carlsbergensis* due to inositol deficiency. Biochim. Biophys. Acta 136, 19- 26, (1967)

- Gosh, A.; Charalampous, F.; Sison, Y.; Borer, R.: Metabolic functions of myo- inositol. I. Cytological and chemical alterations in yeast resulting from inositol deficiency. J. Biol. Chem. 235, 2522- 2530, (1960)
- Gregolin, C.; Singer, T. P.: The D- lactic cytochrome reductase of yeast: its chemical nature, origins, and relation to the respiratory chain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 4, 189- 194, (1961)
- Heslot, H.; Goffeau, A.; Louis, C.: Respiratory metabolism of a "petite negative" yeast, *Schizosaccharomyces pombe* 972h⁻. J. Bacteriol. 104, 473- 481, (1970)
- Hoffman, B. M.; Spilburg, C. A.; Petering, D. H.: Coboglobins: Cobalt substitution and the nature of the prosthetic group-apoprotein interaction in hemoglobin and myoglobin. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 36, 343- 348, (1971)
- Horn, P.; Wilkie, D.: Selective advantage of the cytoplasmic respiratory mutant of *Saccharomyces cerevisiae* in a cobalt medium. Heredity 21, 625- 635, (1966)
- Hirota, Y.: Artificial elimination of the F- factor in *Bact. coli* K- 12. Nature 178, 92, (1956)
- Hirota, Y.: The effect of acridine dyes on mating type factors of *E. coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 46, 57, (1960)
- Iwatsubo, M.; Curdel, A.: Crystalline alcohol dehydrogenase from anaerobic yeast grown in cobalt enriched medium. 7th International Congress of Biochemistry, Tokyo, (1967)
- Knöpfel, H.- P.: Zum Crabtree- Effekt bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida tropicalis*. Dissertation ETH Zürich, Nr. 4906, (1972)
- Laskowski, W.: Induction, par le chlorure de tétrazolium, de la mutation "petite colonie" chez la levure. Heredity 8, 79- 88, (1954)
- Latt, S. A.; Vallee, B. L.: Absorption and circular dichroism (CD) of cobalt carboxypeptidase. Federation Proceedings 28, I, Abstract 1528, (1969)

- Lederberg, J.: Detection of fermentative mutants with tetrazolium. J. Bacteriol. 56, 695, (1948)
- Megnet, R.: Effect of 2- deoxyglucose on *Schizosaccharomyces pombe*. J. Bacteriol. 90, 1032- 1035, (1965a)
- Megnet, R.: Screening of auxotrophic mutants of *Schizosaccharomyces pombe* with 2- deoxyglucose. Mutation Res. 2, 328- 331, (1965b)
- Meyenburg, K. von: Katabolit- Repression und der Sprossungszyklus von *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation ETH Zürich Nr. 4279, (1969)
- Moat, A. G.; Peters, N.: Selection and isolation of auxotrophic mutants with the aid of antibiotics. J. Bacteriol. 77, 673- 677, (1959)
- Nachlas, M. M.; Margulies, S. I.; Seligman, A. M.: Sites of electron transfer to tetrazolium salts in the succinoxidase system. J. Biol. Chem. 235, 2739- 2743, (1960)
- Nagai, S.: Sur la réduction du chlorure de triphényl- tétrazolum par les levures. Compt. rend. Soc. biol. 149, 2047- 2050, (1955)
- Nass, S.: The significance of the structural and functional similarities of bacteria and mitochondria. Int. Rev. Cytol. 25, 55, (1969)
- Ogur, M.; Lindegren, G.; Lindegren, C. C.: A simple screening test for genetic studies of respiration deficiency in yeast. J. Bacteriol. 68, 391- 392, (1954)
- Ogur, M.; St. John, R.: A differential and diagnostic plating method for population studies of respiration deficiency in yeast. J. Bacteriol. 72, 500- 504, (1956)
- Ogur, M.; St. John, R.; Nagai, S.: Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast. Science 125, 928- 929, (1957)
- Ogur, M.; St. John, R.; Ogur, S.; Mark, A. M.: The direct estimation of mutation rate for mutant frequency under special conditions. Genetics 44, 483- 496, (1959)

- Raut, C.: Heritable non- genic changes in yeast by ultraviolet light. *J. Cellular Comp. Physiol.* 44, 463- 475, (1954)
- Robichon- Szulmajster, H. de: Le méso- inositol, facteur de croissance pour *Saccharomyces cerevisiae*. I. Intervention et spécificité du méso- inositol dans le métabolisme des pyrimidines. *Biochim. Biophys. Acta* 21, 313 - 320, (1956)
- Sato, S.; Sato, K.: Mode of action of triphenyltetrazolium chloride on mitochondrial respiration. *J. Biochem.* (Tokyo) 58, 470- 479, (1965)
- Schulman, H. M.: The Effect of cobalt on the synthesis of globin by rabbit reticulocytes in the presence and absence of iron. *FEBS Letters* 12, 119- 120, (1970)
- Sherman, F.; Slonimski, P. P.: Respiration- deficient mutants of yeast. II. Biochemistry. *Biochim. Biophys. Acta* 90, 1- 15, (1964)
- Simpson, R. T.; Vallee, B. L.: Cobalt, an intrinsic active site probe in alkaline phosphatase. *Federation Proceedings* 27, I, Abstract 426, (1968)
- Singer, T. P.; Kearney, E. B.; Gregolin, C.; Boeri, E.; Rippa, M.: On the multiplicity of lactic dehydrogenases in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3, 428- 434, (1960)
- Slater, T. F.; Sawyer, B.; Sträuli, U.: Studies on succinate- tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim. Biophys. Acta* 77, 383- 393, (1963)
- Slonimski, P. P.: Recherches sur la formation des enzymes respiratoires chez la levure. Masson, Paris, (1953a)
- Slonimski, P. P.: Adaptation in Microorganisms. E. I. Gales, R. Davis eds., Cambridge University Press, London, (1953b)
- Slonimski, P. P.: Adaptation respiratoire: développement du système hémoproteique induit par l'oxygene. *Proc. 3rd Int. Congr. Biochem.*, C. Liebecq ed., Academic Press Inc., Publishers, New York, 242- 252, (1956)

- Slonimski, P. P.; Acher, R.; Péré, G.; Sels, A.; Somlo, M.:
Mécanismes de régulation des activités cellulaires chez
les microorganismes. Marseille, Edition C. N. R. S. (1963)
- Smidt, B.: Untersuchungen zur selektiven Hemmung atungskom-
petenter Zellen durch 2, 3, 5- Triphenyl- Tetrazolium-
chlorid bei *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit,
München, (1973)
- Snow, R.: An enrichment method of auxotrophic yeast mutants
using the antibiotic nystatin. *Nature* 211, 206- 207, (1966)
- Sone, N.: Occurrence of cobalt coproporphyrin in *Propioni-*
bacterium arabinosum. *The Journal of Biochemistry* 69,
753- 760, (1971)
- Spilburg, C. A.; Hoffman, B. M; Petering, D. H.: Coboglobins:
Influence of the apoprotein on oxygen binding to cobalto-
myoglobin. *J. Biol. Chem.* 247, 4219- 4223, (1972a)
- Spilburg, C. A.; Bull, C.; Hoffman, B. M.: Coboglobins:
Linkage properties of cobalto- hemoglobin. *Federation Pro-*
ceedings 31, Abstract 1519, (1972b)
- Thouvenot, D. R.; Bourgeois, C. M.: Optimisation de la sélection
de mutants de *Saccharomyces cerevisiae* par la nustatin.
Ann. Inst. Pasteur 120, 617- 625, (1971)
- Webb, M.: The biological action of cobalt and other metals.
III. Chelation of cations by dihydrolipoic acid. *Biochim.*
Biophys. Acta 65, 47- 65, (1962)
- Wilson, J.: Differential effects of TTC on poky and wildtype
colonies of *Neurospora crassa*. *Genetics* 56, 597, (1967)
- Zsolt, J.: Selective action of triphenyltetrazolium chloride
against yeast. *Naturwissenschaften* 47, 255, (1960)

V. Physiologische Eigenschaften der atmungsdefekten Mutanten von Schizosaccharomyces pombe

In den vorhergehenden Abschnitten wurde beschrieben, wie at-
mungsdefekte Mutanten bei Schizosaccharomyces induziert und
angereichert werden konnten, wobei im besonderen Maße auf
die Mechanismen der Anreicherungsverfahren eingegangen wurde.
Im folgenden sollen nun einige physiologische Charakteristika
dieser Mutanten besprochen werden.

V. 1) Wachstum atmungsdefekter Mutanten

V. 1. 1) Wachstumskurven

Impft man Zellen aus einer gerade stationär gewordenen Kultur
des Wildtyps 972h⁻ in ein bereits vorgewärmtes (30° C) Medium,
so erhält man Zellteilungen erst nach etwa 4 - 6 Stunden. Die
geringfügige Zunahme der Trübung (in Kletteinheiten; der Zu-
sammenhang von Kletteinheiten und Titer ist in Fig. 76 darge-
stellt) ist allein einer Zellvergrößerung zuzuschreiben (John-
son, 1968). Diese lag- Periode kann auch durch verschiedenste
Bedingungen der Vorkultur und Kultur nicht wesentlich ver-
kürzt werden (Flury, persönliche Mitteilung). Danach geht die
Kultur in eine exponentielle (logarithmische) Wachstumsphase
über, in der die Generationszeiten durch Temperatur und Be-
lüftung stark beeinflußt werden können. Dieser Teil des Wachs-
tums ist durch fermentativen Stoffwechsel geprägt - während
dieser Zeit wird Äthanol produziert. Nach der Adaptation an die
veränderten Bedingungen in der diauxischen lag- Phase (Glucose
verbraucht, hohe Äthanolkonzentration) wird in einer zweiten

log-Phase (nicht atmungsdefekten Mutanten!) der Alkohol oxidativ abgebaut. Diese zweite log-Phase ist jedoch in der Bestimmung mit Trübungsmessung wenig ausgeprägt. Die untersuchten Mutanten lassen sich nach 3 Kriterien ihres Wachstumsverlaufs klassifizieren:

- 1.) der Dauer der lag-Phase,
- 2.) der Wachstumsgeschwindigkeit in der log-Phase,
- 3.) dem erreichten Endtiter.

Fig. 40 zeigt das Wachstum des Wildtyps 972h⁻ und dreier atmungsdefekter Mutanten in 3 %igem Glucose-Medium. Die drei Mutanten (UV 213, UV 28, UV 17) zeigen etwa die gleiche lag-Phase wie der Wildtyp. Die Mutante UV 213 wächst in der log-Phase wildtypähnlich und erreicht etwa denselben Titer wie 972h⁻. Sie ist, wie alle untersuchten Mutanten, unfähig auf Glycerin zu wachsen, besitzt aber in allen getesteten Atmungskettenenzymen noch Aktivitäten von 20 - 70 Prozent. Das Vorhandensein einer Restatmung bei dieser Mutante kann nicht ausgeschlossen werden. Die beiden anderen Mutanten erreichen jedoch nur einen niedrigeren Titer. Die Mutanten in Fig. 41 (UV 36, UV 110 und UV 70) weisen eine mittlere log-Phase auf. Der Endtiter entspricht dem der vorher besprochenen Gruppe. Die in Fig. 42 dargestellten Wachstumskurven stammen von Mutanten mit stark verlängerter lag-Phase. Die in allen getesteten Enzymaktivitäten stark geschädigte UV 67 zeigt die längste lag-Phase, aber eine wildtyp-ähnliche log-Phase.

Für die Wachstumskurven aller petites wurden Kulturen verwendet, welche von ihrer Isolierung an etwa die gleiche Anzahl von Generationen durchlaufen hatten (etwa 20 Anzuchten).

Es wurde von Ephrussi et al. (1956) gezeigt, daß sich die Generationszeiten einer ρ^- -Mutante während der log-Phase zwar nicht verändert, wenn sie über 4 Passagen gezogen wurde; eine drastische Veränderung ergab sich aber, als nach etwa 450 Transfers das Wachstumsverhalten erneut geprüft wurde. Das früher langsame logarithmische Wachstum war nun einem wildtypähnlichen gewichen. Um diesen "Trainingseffekt" bei atmungsdefekten Mutanten (Slonimski, 1958) zu vermeiden, wurden die erwähnten Vorsichtsmaßnahmen getroffen.

V. 1. 2) Flockenbildung

Einige atmungsdefekte Mutanten (pet 447, 448, 463, 464, 467, 485, 492) zeigen während ihres Wachstums von Beginn der logarithmischen Phase bis zum Ende der stationären Phase Flockenbildung, das heißt Zellaggregate von mehr als 10 bis einigen hundert Zellen. Calleja (1970), welcher diesen Effekt bei einem Wildtypstamm von Schizosaccharomyces beobachtete, schließt auf eine Veränderung der Zellmembran. Ob solche Veränderungen bei diesen Mutanten für die Flockenbildung verantwortlich sind und inwieweit diese ein sekundärer Effekt der Mutation zur Atmungsdefizienz sind, wurde nicht geprüft.

V. 2) Osmotische Heilbarkeit und Temperatursensitivität

Eine Rückführung eines Mutantenphänotyps zum Wild- Phänotyp (oder wildtypähnlichen Phänotyp) kann auf zweierlei Weise bewerkstelligt werden.

- a) auf genetischem Wege durch Rückmutation oder Reversion (Suppression)
- b) rein phänotypisch durch Veränderung der physiologischen Bedingungen wie pH, Temperatur und osmotischer Wert.

Osmotisch heilbare und temperatursensible Mutanten sind bei Auxotrophen von Saccharomyces (Hawthorne und Friis, 1964) und Schizosaccharomyces relativ häufig (Loprieno, 1969; Darben, 1966; Bonatti et al., 1972). Dieser Phänotyp wird Mutanten mit Basenpaarsubstitution des missense-Typs zugeschrieben. So fanden Hawthorne und Friis (1964) unter 231 auxotrophen Mutanten 56 osmotisch heilbare. Dabei erwiesen sich Glucose, Glycerin und KCl als besonders wirksam.

99 Mutanten von Schizosaccharomyces mit verschiedenen Atmungsdefizienzen (Tab. 10) wurden in allen Kombinationen von drei Temperaturen (25°, 30° und 35°) und drei Glycerinkonzentrationen (30 g, 100 g, 360 g/l + 0,1 % Glucose) getestet (Methodik nach Megnet, 1966 und Munz und Leupold, 1970), wobei sich keine der untersuchten Mutanten als osmotisch heilbar oder temperatursensibel erwies. Pretsch (1973) konnte jedoch bei Schizosaccharomyces Mutanten isolieren, welche bei 25° auf Glycerin zu wachsen vermögen, nicht aber bei 36° C.

V. 3) Einfluß der Atmungsdefizienz auf die Adeninbiosynthese

Adeninbedürftige Mutanten mit Mutationen in den Genen *ade 1* und *ade 2* von Saccharomyces akkumulieren ein rotes Pigment, welches eine Zwischenstufe in der Adeninbiosynthese darstellt (Smirnov et al., 1967). Eine Doppelmutation aus *ade 1* oder *ade 2* mit bestimmten genischen oder allen extrakaryotischen Mutationen zur Atmungsdefizienz verursacht eine Verfärbung des roten Pigments nach braun oder weiß. Bei Schizosaccharomyces wurde das gleiche Phänomen beobachtet. Manche RD-Mutanten zeigen in Kombinationen mit Mutationen der Gene *ade 6* und *ade 7* ein verändertes Pigment. Eine Beziehung zwischen Verfärbung des Pigments und

bestimmten Mutantenphänotypen konnte nicht gefunden werden.

V. 4) Zusammenfassung

1.) Aufgrund von Wachstumskurven konnten die atemungsdefekten Mutanten bezüglich ihrer verlängerten lag-Phase und niedrigeren Endtiters klassifiziert werden.

2.) Sämtliche 99 untersuchten Mutanten erwiesen sich weder als osmotisch heilbar noch temperatursensibel.

3.) Ein Teil der RD-Mutationen verursachte eine Veränderung des roten Pigments der Adeninbiosynthese.

V. 5) Diskussion

1.) Die Mutante UV 67 zeigt einen charakteristischen Wachstumsverlauf mit langer lag-Phase, aber wildtypähnlicher log-Phase. Dieser Wachstumsverlauf ist mehrere Male hintereinander reproduzierbar, doch wurde der Stamm noch nicht so oft gezogen, daß ein ähnlicher Trainingseffekt wie bei den von Slonimski beschriebenen petites zu finden war.

2.) Osmotisch heilbare und temperatursensible Mutanten finden sich mit ungleicher Häufigkeit unter auxotrophen Mutanten von Saccharomyces. Während z.B. zahlreiche adeninabhängige Mutanten temperatursensibel sind, wurden keine temperatursensiblen Tryptophanmutanten gefunden. Eine ähnliche Situation könnte bei RD-Mutanten vorliegen. Für die Tests auf osmotische Heilbarkeit bei Schizosaccharomyces muß jedoch die Einschränkung gemacht werden, daß Glycerin vielleicht nicht das geeignete Agens für die osmotische Heilbarkeit darstellt. Ein Einfluß von höheren Salzkonzentrationen wurde nicht geprüft. Temperatursensible Mutanten wurden von Pretsch (1973) direkt selektiert: ihre Phänotypen sind noch genau zu analysieren.

3.) Die Veränderungen des roten Pigments durch einige Atmungsdefizienzen eignen sich gut für Kreuzungsanalysen. Als Selektionsmittel angewandt, hat es den Nachteil, daß nicht alle Mutantentypen erfaßt werden.

V. 6) Literaturverzeichnis zum Abschnitt "Ergebnisse V"

- Barben, H.: Allelspezifische Suppressormutationen von *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetica* 37, 109- 148, (1966)
- Donatti, S.; Simili, M.; Abbondandolo, A.: Isolation of temperature- sensitive mutants of *Schizosaccharomyces pombe* *J. Bacteriol.* 109, 484- 491, (1972)
- Calleja, G. B.: Flocculation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Gen. Microbiol.* 64, 247- 250, (1970)
- Ephrussi, B.; Slonimski, P. P.; Yotsuyanagi, Y.; Tavlitzki, J.: Variations physiologiques et cytologiques de la levure au cours du cycle de la croissance aerobie. *Compt.- rend. Lab. Carlsberg, Sér. physiol.* 26, 87- 102, (1956)
- Hawthorne, D. C.; Friis, J.: Osmotic- remedial mutants. A new classification for nutritional mutants in yeast. *Genetics* 50, 829- 839, (1964)
- Johnson, B. F.: Morphometric analysis of yeast cells. II. Cell size of *Schizosaccharomyces pombe* during the growth cycle. *Exptl. Cell Res.* 49, 59 - 68, (1968)
- Loprieno, N.: Negative interallelic complementation of ad- 6 temperature- dependent mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *Rendic. Acad. Naz. Lincei, Cl. Sci. Fis. Mat. Natur.* 47, 211- 217, (1969)
- Megnet, R.: Osmotic remedial and osmotic sensitive mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *Experientia* 22, 216, (1966)
- Munz, P.; Leupold, U.: Characterization of ICR- 170- induced mutations in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mutation Res.* 9, 199- 212, (1970)
- Pretsch, W.: Diplomarbeit, München, 1973, in Vorbereitung
- Slonimski, P. P.: Respiration and the growth of yeast. *Society of Chemical Industry Monograph No 3*, (1958)
- Smirnov, M. N.; Smirnov, V. N.; Budovski, E. I. ; Inge- Vechtomov, S. G.; Serebryakov, N. G.: Red pigment of an adenine- deficient mutant of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology* 1, 536 - 543, (1967)

VI. Biochemische Klassifizierung der atmungsdefekten Mutanten von Schizosaccharomyces pombe

In den vorhergegangenen Kapiteln wurde beschrieben, wie atmungsdefekte Mutanten bei Schizosaccharomyces pombe mit verschiedenen Mutagenen induziert, durch unterschiedlich wirkende Selektionssysteme angereichert und teilweise aufgrund ihres Wachstumsverhaltens charakterisiert wurden. Im folgenden sollen die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen durch enzymatische Tests und Cytochromspektren besprochen werden. Wie schon im Kapitel über die Selektionssysteme vorweggenommen, wurden mit Hilfe von TTC Mutanten angereichert, welche Defekte in verschiedenen Bezirken der Atmungskette aufwiesen.

Die rasche Entwicklung in der Erforschung der Atmungskettenkomponenten und ihrer Wechselwirkungen rechtfertigt es, kurz den Aufbau der Atmungskette nach den heutigen Vorstellungen zu umreißen.

VI. 1) Die mitochondriale Atmungskette

Seit Mitchell 1961 seine Hypothese veröffentlichte, daß die Energiespeicherung in der Mitochondrienmembran das Ergebnis eines sich bildenden transmembranen Protonengradienten ist, bekam die starre Anordnung der Elektronencarrier in der Atmungskette einen dynamischen Aspekt. Diese statische Vorstellung mußte spätestens dann aufgegeben werden, als berichtet wurde, daß mehr als nur ein Cytochrom b am Elektronentrans-

port beteiligt sei (Chance et al., 1970; Sato et al., 1971; Wikström, 1971; Wilson und Dutton, 1970; Yu et al., 1972) und daß eines dieser b- Cytochrome und auch Cytochrom a_3 die Eigenschaft haben, ihre Redoxpotentiale Versuchsbedingungen entsprechend zu ändern.

Seit langem wird die Atmungskette in 4 Komplexe aufgeteilt, die einzeln isoliert und im Rekonstitutionsexperiment wieder in die Atmungskette integriert werden können (Hatefi et al., 1961). In Fig. 44 ist die Aufteilung der Atmungskette in ihre 4 Komplexe dargestellt. Die Elektronen können nur von zwei Flavoproteinen auf die Cytochromkette übertragen werden. Eines dieser Flavoproteine übernimmt die Elektronen von NADH, das andere von Bernsteinsäure. Das Flavinmononucleotid (FMN) der NADH-Dehydrogenase stellt mit zwei Schwefeleisenproteinen den Komplex I, das Flavinadeninnucleotid (FAD) der Succinatdehydrogenase mit 3 Schwefeleisenproteinen (und einem nicht näher charakterisierten Elektronencarrier (?) ?) den Komplex II dar. Beide Dehydrogenasen übertragen ihre Elektronen auf Komplex III, wobei der Elektronenfluß von Komplex I (eventuell auch Komplex II) über das Coenzym Q (Q 10 bei Rattenleber, Q 6 bei Hefe) läuft (Albracht et al., 1972 ab). Komplex III enthält die b- Cytochrome ($b-558$ und $b-566 = b_T = b_i$; $b-562 = b_K$. Nach Slater ist es besser, die b- Cytochrome allein nach ihrer Wellenlänge bei Raumtemperatur zu bezeichnen: siehe Slater, 1973), das Cytochrom c_1 und ein Schwefeleisenprotein (Ercińska und Wilson, 1972; Wilson et al., 1972). In der Höhe des Komplexes III ist der Elektronenfluß durch Antimycin A hemmbar (Berden

und Slater, 1970, 1972; Dutton et al., 1972; Muraoka und Okada, 1972; Nelson et al., 1972; Rieske, 1971; Rieske und Zaugg, 1962; Sato et al., 1972). Von dort aus werden die Elektronen auf Cytochrom c übertragen, welches im Gegensatz zu den anderen Cytochromen nicht strukturgebunden und daher löslich ist (Hadenbach, 1969; Paléus, 1967). Der Komplex III kann durch Phenazinmethosulphat überbrückt werden, wobei die Elektronen direkt von der Succinatdehydrogenase auf das Cytochrom c übertragen werden. Die Elektronen fließen dann über Komplex IV zum Sauerstoff. Komplex IV besteht aus den Cytochromen a und a_3 und zwei Kupferproteinen (Myer und King, 1969). Durch geringe Cyanidkonzentrationen kann der Elektronentransport in der Höhe von Komplex IV blockiert werden (Smith, 1954; Yoshikawa und Oorii, 1971ab). Ein weiterer Elektronentransportweg führt vom Ascorbat unter Vermittlung von N, N, N', N'-Tetramethyl- p- Phenylendiamin (TMPD) zu Cytochrom c und von dort aus über Komplex IV zum Sauerstoff (Taggart und Sanadi, 1972).

Ein anderes Konzept der Darstellung der Atmungskette ist in Fig. 45 dargestellt. Die Elektronencarrier sind in drei Gruppen mit jeweils einheitlichem, "fixiertem" Redoxpotential angeordnet (Grimme, 1972; Hatefi und Hanstein, 1972): Gruppe I mit einem Potential um -400mV, Gruppe II mit $\pm$ 0mV und Gruppe III mit + 300 mV. Gruppe I auf der Substratseite besteht aus Dehydrogenasen und Nichthäm-eisen- Proteinen, Gruppe II aus Succinatdehydrogenase, Nichthäm-eisen- Proteinen, Coenzym Q und Cytochrom b_K . Die Cytochrome c_1 , c und a, welches mit Kupferionen assoziiert ist, bilden die Gruppe III. Zwischen diesen Car-

riergruppen sind drei Einzelcarrier angeordnet, die sich durch variable Redoxpotentiale auszeichnen: eine noch unbekannte Substanz (?) zwischen den Gruppen I und II mit einem Redoxpotential zwischen -200 und 0mV, ein Cytochrom b zwischen den Gruppen II und III und Cytochrom a_3 zwischen Gruppe III und Sauerstoff. Beide bekannten Cytochrome b und a_3 sind nach diesem Konzept in der Lage, Elektronen aus der Gruppe mit tieferem Redoxpotential zu der mit höherem Potential zu transferieren und erhalten deshalb das Suffix T (T = transducing: z. B. b_T und a_{3T}).

VI. 2) Cytochromspektren bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*

VI. 2. 1) Tieftemperaturspektroskopie mit ganzen Zellen

Bei *Saccharomyces cerevisiae* ist es möglich, Raumtemperatur-Differenzspektren der Cytochrome mit ganzen Zellen zu erhalten, welche zumindest eine Aussage über das Vorhandensein der Cytochrome aa_3 , $b + c_1$ und c zulassen (siehe Fig. 32, 33 und 34). Bei Raumtemperaturspektren ganzer Zellen von *Schizosaccharomyces pombe* lassen sich nur zwei sehr breite Maxima für die Cytochrome $c + c_1 + b$ und aa_3 unterscheiden. Ursache der schlechten Auflösung ist die durch die dickere Zellwand verursachte größere Lichtstreuung, und vielleicht ein etwas geringerer Cytochromgehalt pro Zelle. Eine bessere Auflösung der Einzelcytochrome kann entweder durch Tieftemperaturspektroskopie oder durch Isolierung und Reinigung mitochondrialer Strukturen erreicht werden. Tieftemperaturspektren wurden nach der Methode von Keilin (1929) (eine detaillierte Beschreibung der Spektroskopie ist in D. Keilin, 1960 gegeben) von

Sherman und Slonimski (1964) als schneller Vortest zur Charakterisierung der Mutanten angewandt. Diese Methode kam auch bei den atmungsdefekten Mutanten von Schizosaccharomyces zur Anwendung, wobei das Spektrum des dithionitreduzierten, auf -190°C gekühlten Zellbreis photographiert und der Hochglanzabzug des photographierten Spektrums nachträglich densitometriert wurde. Das Ergebnis einer solchen Auswertung ist für den Wildtyp 972h⁻ in Fig. 46 dargestellt. Diese Spektren erlauben jedoch keine quantitative Aussagen über die Cytochrome b und c₁, besonders wenn diese in stark verringerten Mengen vorliegen.

Weitaus besser ist die spektrale Auflösung bei absoluten Tieftemperaturspektren (Heyman-Blanchet, 1963). Fig. 47 (aus Claisse, 1969) zeigt solche Spektren für Saccharomyces cerevisiae und Schizosaccharomyces pombe. An beiden Organismen läßt sich eine befriedigende Auflösung für die Cytochrome b und c₁ erreichen. Auffallend ist die im Verhältnis zu den anderen Cytochromen geringe Konzentration von Cytochrom aa₃ bei Schizosaccharomyces.

VI. 2. 2) Spektren isolierter Mitochondrien bei Raumtemperatur

Eine Möglichkeit zur besseren Auflösung der Cytochrome liegt in der Verwendung differentiell gereinigter Mitochondrien. Sie ergibt für Saccharomyces eine befriedigende Darstellung von Cytochrom b (gesamt) als Maximum, während es bei Schizosaccharomyces nur als Schulter erscheint (Fig. 49 und 50).

Um zu versuchen, die Auflösung zu verbessern, wurden Mitochondrien von Schizosaccharomyces über Sucrosegradienten zentrifugiert, ihre Lage durch die Enzyme Succinatdehydrogenase (SDH,

in der Innenmembran) und Malatdehydrogenase (MDH, lösliches Matrix-enzym, dient als Kriterium für intakte Mitochondrien) bestimmt und die spektralen Eigenschaften der Mitochondrienfraktion untersucht. Aber auch für gradientengereinigte Mitochondrien ergab sich keine bessere Auflösung der Cytochrome b und c_1 . Weitaus weniger aufwendig und erfolgversprechender ist daher die folgende Methode:

VI. 2. 3) Herstellung submitochondrialer Partikel und getrennte Darstellung der Cytochrome b und c_1

Cytochrom c hat ein Absorptionsmaximum, das nahe an dem von Cytochrom c_1 liegt und dadurch dessen spektrale Untersuchung stört. Da es jedoch im Unterschied zu den übrigen Cytochromen löslich ist, kann es leicht aus den Mitochondrien entfernt werden. Durch mehrmalige Behandlung mit Ultraschall wird der Membranverband der Mitochondrien zerstört, wobei sich Cytochrom c herauslösen läßt und sich die Innenmembranteilchen wieder zu kleinen, kugelförmigen Gebilden, den sogenannten submitochondrialen Partikeln schließen. Dieser Vorgang ist in Fig. 52 schematisch dargestellt. Submitochondriale Partikel (SMP) enthalten im wesentlichen die Cytochrome aa_3 , b, c_1 , Flavoproteine und Coenzym Q. Ein Differenzspektrum von Cytochrom c_1 kann durch Zugabe von Ascorbat im Vergleich zur oxidierten Suspension dargestellt werden. Der Elektronenfluß über Cytochrom aa_3 zum Sauerstoff wird mit KCN gehemmt.

Antimycin A, ein von Strong et al. (1961) entdecktes Reagens, hemmt den Elektronenfluß zwischen den b- Cytochromen und Cytochrom c_1 (Fig. 51). Nach Berden und Slater (1972) bindet Antimycin A allosterisch an Cytochrom b. Dadurch kann eine selektive Reduktion von Cytochrom b vorgenommen werden.

VI. 3) Enzymtests zur Lokalisierung der Defekte in der Atmungskette

Zwei Tests, mit denen die ganze Atmungskette von der Succinatdehydrogenase bis zur Endoxidase erfaßt werden kann, sind die Succinat- Cytochrom c- Reduktase und die Cytochrom c- Oxidase. Positive Succinat- Cytochrom c- Reduktase- Reaktion läßt auf die Intaktheit von Komplex I, Coenzym Q und Komplex III schließen. Phenazinmethosulfat (PMS), dem Reaktionsgemisch zugegeben, vermag die Elektronen direkt von der SDH zu übernehmen und auf das Cytochrom c zu übertragen, wobei CoQ und Komplex III umgangen werden. Die Aktivität von Komplex IV wird durch die Geschwindigkeit der Oxidation reduzierten Cytochroms bestimmt. Für diese beiden, bei allen Mutanten getesteten Enzymreaktionen wurde die pH- Abhängigkeit geprüft (mit Sörensen- Puffer, 0,1 M) wobei sich für alle Reaktionen ein pH- Bereich von 7 - 7,4 als optimal erwies (Fig. 66, 67). Die Tests wurden deshalb bei pH 7,2 ausgeführt.

Ein positiver NADH- Cytochrom c- Reduktase- Test zeigt ebenfalls die Intaktheit von CoQ und Komplex III, zusätzlich die Funktionsfähigkeit von Komplex I an. Eine Überbrückung von CoQ und Komplex III durch PMS ist bei diesem Test nicht möglich, weshalb die Funktionsfähigkeit des Komplex I allein nicht getestet werden kann.

Durch den NADH- Menadion- Reduktase- Test und den Succinat- Menadion- Reduktase- Test kann die Funktionsfähigkeit von Komplex I und II direkt geprüft werden. Die Ergebnisse dieser Tests müssen nicht notwendigerweise mit den entsprechenden Cytochrom c- Reduktase-Tests übereinstimmen, da die Übernahmestelle

der Elektronen an den Dehydrogenasen für verschiedene Akzeptoren unterschiedlich sind (Hare und Crane, 1971).

Im Coenzym Q- Cytochrom c- Reduktase- Test kann die Funktionsfähigkeit des Komplex III getestet werden. Die Reaktionsmechanismen dieser Tests sind in "Methoden" genauer beschrieben; eine Zusammenfassung der Tests und der von ihnen erfaßten Komplexe ist in Tab. 20 gegeben.

VI. 4) Biochemische Eigenschaften der ρ^- - Mutanten bei *Saccharomyces cerevisiae*

In einem früheren Kapitel wurden die Veränderungen der mitochondrialen DNS in ρ^- - Mutanten besprochen, welche eine große Variationsbreite aufweisen. Betrachtet man jedoch petites mit gleichem Kerngenom, so sind ihre biochemischen Eigenschaften weitgehend gleich, so daß hier zusammenfassend für alle vegetativen petites gesprochen werden darf.

Petites zeichnen sich aus durch die Bildung kleinerer Kolonien, da sie Glucose nur vergären, nicht aber veratmen können und so weitaus weniger Energie gewinnen (Chen, 1950; Chen et al., 1950; Ephrussi, 1949, 1953; Ephrussi und Chimenes, 1949; Tavlitzki, 1949). Ursache der Atmungsdefizienz ist ein völliges Fehlen der membrangebundenen Cytochrome a_a , b und c_1 und Veränderungen in einigen anderen Atmungskettenenzymen (Kovachevich, 1964; Mackler et al., 1965; Perlman und Mahler, 1970; Slonimski, 1958; Slonimski und Ephrussi, 1949); damit verbunden sind morphologische Änderungen der mitochondrialen Innenmembran (Avers et al., 1965; Smith et al., 1969; Yotsuyanagi, 1962). Cytochrom c ist in norma-

ler Menge vorhanden und höchstwahrscheinlich unverändert (Verdiere und Lederer, 1971; Yaoi, 1967). Größere Veränderungen zeigen sich in den Zitronensäurezyklus-Enzymen (Amaha und Sai, 1969; Hirsch, 1952; Sai und Amaha, 1965; Slonimski, 1950; Slonimski und Hirsch, 1952), in der ATPase (Kovac und Weissová, 1968) und im mitochondrialen Ionentransport und Energietransfersystem (Kovac et al., 1972). Petites sind ebenfalls durch Veränderungen einiger mitochondrialer Lipide ausgezeichnet (Gordon und Steward, 1969; Jakovic et al., 1968; Kovac et al., 1967). Mehrere mitochondriale Defekte sind jedoch keine direkte Folge der petite-Mutation, sondern wohl einer größeren Empfindlichkeit für Glucoserepression zuzuschreiben (Gordon und Steward, 1969; McClary und Bower, 1968; Smythe et al., 1969).

Hauptkriterien, weil leicht nachzuprüfen, blieben für die ρ^- -petites die Unfähigkeit, auf nichtvergärbarem Substrat zu wachsen, auf vergärbarem Substrat kleinere Kolonien zu bilden und der Verlust der strukturgebundenen Cytochrome.

VI. 5) Atmungsdefekte karyotische Mutanten von Schizosaccharomyces pombe mit ρ^- - Phänotyp

Unter den kernkodierten atmungsdefekten Mutanten von Saccharomyces cerevisiae findet man häufig solche mit ρ^- -Phänotyp (Typ II-Spektrum nach Sherman und Slonimski, 1964; Mutanten p_1 , p_6 und p_7). Diese phänotypische Ähnlichkeit führte Bulder zu der Vermutung, daß es sich bei den von ihm isolierten RD-Mutanten von Schizosaccharomyces pombe um cytoplasmatische petites handelte, worauf er Schizosaccharomyces pombe wegen der geringen Anzahl

dieser Mutanten zwischen die petite-positive und petite-negative Gruppe stellte.

Die Tieftemperaturspektren von 3 Mutanten Bulders (pet 1, pet 2 und pet 3) zeigen das typische ρ^- -Spektrum. (Fig. 54; zum Vergleich das Spektrum des Wildtyps in Fig. 55) Das gleiche Spektrum von ρ^- -Typ fanden Heslot et al. (1970) für die ebenfalls von Bulder stammende Mutante pet B, bei der sie noch eine Ähnlichkeit mit der ρ^- -Mutante zeigen konnten, nämlich strukturell veränderte Mitochondrien. Wie schon erwähnt, erweisen sich die hier untersuchten Mutanten Bulders wie auch die von Heslot et al. untersuchte als höchstwahrscheinlich karyotisch vererbt.

VI. 6) Klassifizierung genischer atmungsdefekter Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae*

Kernkodierte atmungsdefekte Mutanten sind bei Hefen in großer Vielzahl beschrieben worden. Bevor auf die genischen Mutanten von *Schizosaccharomyces* eingegangen wird, welche nicht den ρ^- -Phänotyp aufweisen, soll versucht werden, die bisher beschriebenen Mutanten von *Saccharomyces* in einige Gruppen zu unterteilen. Die Mutanten können 14 verschiedenen Klassen zugeordnet werden.

- 1.) Mutanten mit vielen Cytochromdefizienzen, welche sekundär zu ρ^- werden,
- 2.) Mutanten mit vielen Cytochromdefizienzen, welche ρ^+ bleiben,
- 3.) Mutanten, welche nur auf Lactat zu wachsen vermögen,
- 4.) Mutanten, welche nur auf Glycerin zu wachsen vermögen,

- 5.) Mutanten mit allen Cytochromen, jedoch a und b verringert, wobei a stärker der Glucoserepression unterliegt als im wt,
- 6.) Mutanten ohne die Cytochrome b und c_1 ,
- 7.) Mutanten ohne Cytochrom a,
- 8.) Mutanten mit verschieden stark reduziertem Cytochrom c,
- 9.) Mutanten, deren Mitochondrien niedrigeres P : O- Verhältnis aufweisen, außer bei Überschuß von ADP (op_1),
- 10.) Mutanten mit gestörtem Energiehaushalt, welche nicht auf Glycerin zu wachsen vermögen, jedoch Wildtypcytochrome besitzen,
- 11.) Wie 10.) jedoch mit quantitativ verringerten Cytochromen,
- 12.) Porphyrinauxotrophe Mutanten,
- 13.) Fettsäure- auxotrophe Mutanten, welche nicht auf Glycerin zu wachsen vermögen.

Atmungsdefekte Mutanten mit Wildtypcytochromen und Defizienzen in einem oder mehreren Cytochromen wurden auch bei Saccharomyces lactis (Herman und Griffin, 1968) gefunden.

Eine Klassifizierung, welche allein auf spektralen Befunden beruht, muß notwendigerweise einseitig sein. Ebner et al. (1973, im Druck) konnten zeigen, daß unter Mutanten der gleichen spektralen Gruppe biochemisch außerordentlich verschiedene Mutanten zu finden sind. Untersucht man die Mutanten einer spektralen Gruppe eingehender, so beginnen die einzelnen Gruppen wieder in viele Untergruppen zu zerfallen. Eine Mutante, welche in erster Linie durch den Verlust eines einzelnen Cytochroms gekennzeichnet war, erweist sich bei genauerer Untersuchung als hochgradig pleiotrope Mutante. Eine Klassifizierung der atmungsdefekten Mutanten wird daher mit zunehmender Charakterisierung der einzelnen Mutanten immer komplexer werden.

VI. 7) Cytochrom c in Wildtyp und atungsdefekten Mutanten
von Schizosaccharomyces pombe

Margoliash und Schejter (1966) konnten in vergleichenden Untersuchungen der c- Cytochrome verschiedenster Herkunft zeigen, daß sich die alpha- Region der Cytochrome durch Tieftemperaturspektroskopie in drei Komponenten (c- α_1 , c- α_2 und c- α_3) zerlegen läßt. Eine Ausnahme bildet das Cytochrom c der Bäckerhefe, welches nur die Banden c- α_1 und c- α_3 zeigt. Unter 15 weiteren Hefen (Claisse, 1969) war Schizosaccharomyces pombe die einzige, welche eine c- α_2 -Bande besaß. Unterwirft man das Cytochrom c von Saccharomyces einer Säulentrennung und nachfolgender Chromatographie (Slo-nimski et al., 1965), so ist es möglich, zwei Cytochromspecies, iso-1-Cytochrom c und iso-2-Cytochrom c zu trennen. Mit denselben Methoden erhält man bei Schizosaccharomyces nur ein Cytochrom c, wobei alle Fraktionen das Vorhandensein einer c- α_2 - Bande zeigen. Das Cytochrom c von Schizosaccharomyces pombe ist also deutlich von dem der Bäckerhefe unterschieden.

Für die Untersuchungen des Cytochroms c bei Mutanten von Schizosaccharomyces kommen nur Spektren ganzer Zellen in Betracht, da bei der mechanischen Mitochondrienpräparation wechselnde Mengen Cytochrom c verlorengehen. In Fig. 53 sind absolute Tieftemperaturspektren des Wildtyps 972h⁻ und von acht atungsdefekten Mutanten dargestellt. Diese Spektren sind mit den später gezeigten von isolierten Mitochondrien der gleichen Mutanten nicht direkt vergleichbar, da sich die Cytochrommenge hier auf eine ungefähr gleichbleibende Zellmenge (Schichtdicke 2 mm), im anderen Fall jedoch auf eine bestimmte Menge mitochondrialen

Proteins bezieht. Der Wildtyp 972h⁻ zeigt deutlich die 3 alpha-Banden des Cytochrom c: c-alpha₁ bei 545 nm, c-alpha₂ bei 542 nm und c-alpha₃ bei 533 nm. Während allein UV 16 stark reduzierte Mengen Cytochrom c aufweist, erreichen alle übrigen Mutanten (UV 17, 28, 36, 70, 119, 203 und 213) mindestens die Hälfte der Cytochrom c- Menge des Wildtyps. Bemerkenswert ist, daß alle Mutanten (auch die in Fig. 54 dargestellten Mutanten pet 1-5) die c-alpha₂- Bande besitzen.

VI. 8) Mutanten mit Defekten in Komplex I und /oder II und ihre Pleiotropie

Als Mutanten des Komplexes I sind solche anzusehen, welche im NADH- Menadion- Reduktase- Test keine oder verringerte Aktivität zeigen. Mutanten des Komplexes II sind dadurch charakterisiert, daß sie im Succinat- Menadion- Reduktase- und im Succinat- Cytochrom c- Reduktase- Test mit PMS keine oder verringerte Aktivität zeigen. Sowohl Komplex I- als auch Komplex II- Mutanten finden sich sehr häufig, doch zeigen alle diese Mutanten zahlreiche pleiotrope Effekte z. B. in Komplex I oder II, Komplex III und/ oder Komplex IV. Es läßt sich deshalb nicht entscheiden, ob der primäre Defekt auf eine Mutation zurückzuführen ist, welche direkt die Synthese und Funktionsfähigkeit von Komplex I und/oder II eine Folgeerscheinung von Defekten in anderen Komplexen ist. Eine Succinatdehydrogenase- Mutante wurde von Kok (1972) für Saccharomyces cerevisiae beschrieben, doch ist bei dieser Mutante nichts über die Funktionsfähigkeit der übrigen Atmungskettenkomplexe bekannt. Succinat- Dehydrogenase- und NADH- Dehydrogenase- Mutanten des oben beschriebenen Typs sind auch die von

Mackler et al. (1965) beschriebenen Mutanten p_3 , p_{12} und p_{13} . Die Komplex I- und II- Mutanten sind aus Tabelle 10 ersichtlich und werden hier nicht mehr eigens aufgeführt.

VI. 9) Mutanten mit Defekten in Coenzym Q und Komplex III

Mutanten mit funktionellen Defekten in dem Teil der Atmungskette, welcher Coenzym Q und Komplex III umfaßt, treten ebenfalls unter den untersuchten atmungsdefekten Mutanten von Schizosaccharomyces pombe sehr häufig auf. Sie sind durch keine oder nur geringe Aktivität im Succinat- Cytochrom c- Reductase- Test charakterisiert. Nach Überbrückung von CoQ und Komplex III mit PMS zeigen die Mutanten teilweise oder vollständige Aktivität. Aus den in Tab. 10 verzeichneten Mutanten dieses Typs wurden elf ausgewählt, nämlich UV 9 (pet 12), UV 16 (pet 19), UV 17 (pet 20), UV 28 (pet 31), UV 30 (pet 33), UV 36 (pet 39), UV 67 (pet 69), UV 70 (pet 71), UV 119 (pet 100), UV 203 (pet 153) und UV 213 (pet 161). Diese Mutanten wurden mit der Methode der substratreduzierten mitochondrialen Partikel spektral und nach folgenden Test enzymatisch untersucht: NADH- Menadion-Reductase, Succinat- Menadion- Reductase, Succinat- Cytochrom-c-Reductase ohne und mit PMS, CoQ- Cytochrom c-Reductase und Cytochrom c- Oxidase. Die ausgewählten Mutanten lassen sich in zwei Gruppen unterteilen, welche sich durch verschiedene Funktionsfähigkeit des Atmungskettensegments CoQ + Komplex III auszeichnen. Bei den Mutanten UV 9, UV 16, UV 17, UV 28, UV 30 und UV 67 ist keine oder nur sehr geringe (max. 1 % der Wildtypaktivität) Succinat- Cytochrom c- Reduktase- Aktivität festzustellen, während sich bei der zweiten Gruppe (UV 36, UV 70, UV 119, UV 203 und UV 213) noch geringe Aktivitäten (4 - 28 % der Wildtypaktivität) be-

stimmen lassen, welche durch PMS um das vier- bis sechsfache gesteigert werden können. Zusammen mit den Ergebnissen des CoQ-Cytochrom c- Reductase- Tests betrachtet, kann für UV 36, UV 119 und UV 213 die Ursache für die geringe Aktivität der Succinat-Cytochrom c- Reductase zum Teil in der ungenügenden Funktionsfähigkeit von CoQ gesucht werden. Bei der ersten Gruppe finden sich teilweise auch geringe Aktivitäten in Komplex I (UV 9, UV 17, UV 28, UV 30 und UV 67) und Komplex IV (UV 17, UV 28, UV 30 und UV 67), so daß auch hier umfassendere Defekte vorliegen. Die b- Cytochrome der SMPs wurden durch Succinatreduktion nach AA- Hemmung, c_1 durch Ascorbatreduktion dargestellt. Die Spektren sind in Fig. 60 - 65 gezeigt.

Die Absorptionsmaxima der einzelnen Cytochrome liegen folgendermaßen:

alpha- Banden: aa_3 bei 607- 609 nm, b_{562} (b_K) bei 562 nm, b_{558} (b_T) bei 558 nm, c_1 bei 552 nm.

beta- Banden: b bei 530 nm, c_1 bei 522 - 523 nm.

gamma- Banden: aa_3 bei 446 nm, b bei 429 nm, c_1 bei 422 - 426 nm.

Deutliche Abweichungen der Cytochrommenge zeigen die Mutanten UV 30, UV 36, UV 67 und UV 213, wobei UV 67 nahezu keine erkennbaren Cytochrome mehr besitzt. UV 17 und UV 119 zeigen nur für die b- Cytochrome ein verringertes Maximum. Ein deutlich verminderter Gehalt an Cytochrom c_1 läßt sich bei den Mutanten UV 30 und UV 213 feststellen; UV 30 weist sehr wenig UV 67 gar kein Cytochrom c_1 auf. Die Mutanten UV 9, UV 28, UV 203, UV 16 und UV 70 weichen weder im Cytochrom b- noch Cytochrom c_1 - Gehalt signifikant vom Wildtyp ab. Möglicherweise fehlt UV 9 Cytochrom b_{558} , wie man im Vergleich mit den anderen Mutanten aufgrund des Fehlens der Schulter bei 558 nm

schließen könnte. Dies müßte jedoch mit anderen Methoden überprüft werden. Auf die Eigenschaften der Mutante UV 119 soll später noch näher eingegangen werden.

VI. 10) Mutanten mit Defekten in Komplex IV

Mutanten des Komplexes IV werden durch folgende Kriterien charakterisiert:

- 1.) Teilweises oder gänzlich Fehlen der Absorptionsbanden bei 607 - 609 nm (alpha- Bereich) und 446 nm (Soret- oder gamma-Bereich),
- 2.) Schwache oder fehlende Reduktion oxidierten Cytochroms c in isolierten Mitochondrien.

Die in Tab. 10 aufgeführten Mutanten mit Komplex IV- Defekten besitzen meist mehr oder weniger große Ausfälle in anderen Komplexen.

Bei Saccharomyces sind solche Typen die Mutanten P₄, P₅, P₆, P₇, P₈, P₁₀ und P₁₂.

In Fig. 55 - 59 sind Spektren verschiedener atmungsdefekter Mutanten mit Cytochromoxidaseaktivitäten von 0 bis mehrfacher Wildtypaktivität zusammengestellt. Bezüglich der Cytochrome b, c₁ und c besitzen die Spektren wenig Aussagekraft, da Cytochrom c während der Präparation der Mitochondrien teilweise verloren geht und b und c₁ insgesamt nur als mehr oder weniger ausgeprägte Schulter zu erkennen ist. Das Vorhandensein geringer Mengen von Cytochrom aa₃ läßt sich am besten an der gamma- Bande erkennen.

Betrachtet man die spektralen Befunde zusammen mit den gemessenen Enzymaktivitäten, so findet man in den meisten Fällen eine Korrelation zwischen spektral gemessenem Cytochrom aa₃ und enzymatisch bestimmter Cytochromoxidase- Aktivität. Bei einigen

Mutanten ergeben sich jedoch große Abweichungen, So besitzen z. B. UV 7, UV 117 und UV 268 wildtypähnliches Cytochrom aa_3 - Spektrum, weisen jedoch nahezu keine Cytochromoxidase- Aktivität mehr auf. Offenbar besitzt dieses veränderte Cytochrom aa_3 keine Affinität mehr für reduziertes Cytochrom c. Diese Gruppe von Mutanten muß noch näher untersucht werden.

VI. 11) Mutanten mit gesteigerten Enzymaktivitäten

Unter den atmungsdefekten Mutanten befinden sich solche, die sowohl im Succinat- Cytochrom c- Reduktase- Test ohne und mit PMS, als auch im Succinat- Menadion- Reduktase- Test signifikant über das Wildtypniveau erhöhte Enzymaktivitäten besitzen. Der selbe Effekt kann bei einigen Mutanten für die NADH- Menadion-, die NADH- Cytochrom c- Reduktase und die Cytochromoxidase und für mehrere Enzymaktivitäten zugleich beobachtet werden.

Das Phänomen der erhöhten Aktivität von Atmungsenzymen oder der vermehrten Produktion von Cytochromen wurde von Sherman und Slonimski (1964) bei Cytochrom c- Mutanten beobachtet. Diese cy_1 - Mutanten weisen sowohl erhöhte Lactatcytochrom- c- Reductase, als auch SDH, NADH- Cytochrom c-Reduktase und Cytochromoxidase auf. Die Mutante pet 12 von Saccharomyces lactis Herman und Griffin, 1968) zeigt ebenfalls durchwegs erhöhte Cytochrommengen.

VI. 12) Versuch einer Gliederung der Mutanten

Da sich unter ein- und demselben spektralen Phänotyp eine Vielzahl verschiedener Mutantenphänotypen verbirgt, wäre es ebenso einfach wie irreführend, Mutanten allein unter spektralen Gesichtspunkten zusammenfassen zu wollen. Je eingehender die Mutanten nach verschie-

denen Gesichtspunkten untersucht werden, umso mehr wird der Grad ihrer Pleiotropie erkennbar, so daß z. B. unter denjenigen mit Ausfall eines einzelnen Cytochroms (z. B. aa_2) keine einzige mehr zu finden war, welche in allen übrigen getesteten Aktivitäten Wildtypwerte aufgewiesen hätte. Die in Tab. 10 zusammengefaßten Mutanten sollen deshalb nur grob in vier großen Gruppen zusammengefaßt werden, deren Übergänge fließend sind:

- 1.) Mutanten, die sämtliche Cytochrome aufweisen (gesteigert, voll oder vermindert) und gesteigerten, vollen oder verminderten Enzymaktivitäten; zu dieser Gruppe gehören auch die TTC- und cobaltresistenten Mutanten (Tab. 5 und 8);
- 2.) Mutanten mit fehlender Aktivität in einem Komplex, wobei für alle anderen Komplexe noch Aktivität nachgewiesen werden kann;
- 3.) Mutanten mit fehlender Aktivität in zwei oder drei Komplexen und Aktivitäten in dem oder den übrigen;
- 4.) Mutanten ohne oder mit sehr geringen Mengen aller Cytochrome und fehlenden oder sehr geringen Aktivitäten in allen getesteten Enzymen.

VI. 13) Zusammenfassung

- 1.) Aufbau und Funktion der Atmungskette werden anhand zweier Modelle besprochen.
- 2.) Die Methoden der Spektroskopie werden kurz umrissen.
- 3.) Die zur Charakterisierung der Einzelkomplexe verwendeten Enzymtests werden dargestellt.
- 4.) Die biochemischen Charakteristika der ρ^- -Mutanten werden kurz erwähnt.

- 5.) Die von Bulder isolierten RD- Mutanten zeigen ρ^0 - Typ-Spektren.
- 6.) Es wird eine Klassifizierung der bisher bekannten karyotischen RD- Mutanten bei Saccharomyces vorgenommen.
- 7.) Die untersuchten RD- Mutanten besitzen (mit einer Ausnahme) mindestens 50 % des für Schizosaccharomyces typischen Cytochroms c.
- 8.) Bei Schizosaccharomyces wurden Mutanten mit Defekten in Komplex I und/oder II gefunden, welche alle mehr oder weniger pleiotrop sind.
- 9.) Einige Mutanten mit Defekten im Segment CoQ + Komplex III werden spektral und enzymatisch eingehender untersucht.
- 10.) Es gibt zahlreiche Mutanten mit Defekten in Komplex IV, welche alle mehr oder weniger pleiotrop sind. Mutanten ohne Cytochromoxidase- Aktivität können durchaus normales Spektrum für Cytochrom aa_3 besitzen.
- 11.) Es werden Mutanten mit gesteigerten Aktivitäten in verschiedenen Enzymsystemen der Atmungskette beschrieben.
- 12.) Die Mutanten werden in 4 große Gruppen unterteilt, deren Übergänge jedoch fließend sind.

VI. 14) Diskussion

VI. 14. 1) Methodische Schwierigkeiten und Aussagekraft der spektralen und enzymatischen Befunde

Verschiedene Mitochondrienpräparationen ein und desselben Stammes weisen oft beachtliche Schwankungen ihrer Enzymaktivitäten auf (siehe Sherman und Slonimski, 1964), deren Ursachen verschieden

bedingt sein können. Für enzymatische Untersuchungen wurden meist mehrere Mutanten parallel angezogen und zu gleicher Zeit geerntet. Da die Mutanten zum Teil unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten besitzen, befinden sich die Mutanten, welche die Glucose schneller aufgebraucht haben, bereits länger in der stationären Phase und sind in einem anderen physiologischen Zustand als Mutanten, welche sofort nach Erreichen der stationären Phase geerntet werden. Mitochondrien atmungsdefekter Mutanten sind oft von unterschiedlicher Fragilität (Ebner et al., im Druck) und so können kleinere Mitochondrienbruchstücke leicht bei der Zentrifugation verloren gehen. Die Enzymaktivitäten sind ebenfalls stark davon abhängig, ob intakte Mitochondrien oder Fragmente vorliegen. Um diese Unterschiede möglichst gering zu halten, wurden mit jeder Serie von Mutanten ein Wildtyp mitpräpariert und alle Mitochondrien-suspensionen bei -70°C eingefroren, um bei den Messungen immer von mitochondrialen Fragmenten ausgehen zu können. Die Enzymaktivitäten wurden dann immer in Prozent der Aktivität des in dieser Serie präparierten Wildtyps angegeben. Jede Enzymaktivität wurde mit mindestens zwei verschiedenen Proteinkonzentrationen gemessen. Trotzdem muß für alle Tests und Spektren eine Schwankung von mindestens 20 % angenommen werden. Die Ergebnisse der enzymatischen Tests sind also nur als Vorcharakterisierung, für künftige eingehendere Untersuchungen an ausgewählten Mutanten zu betrachten.

VI. 14. 2) Cytochrom c- Mutanten

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht speziell nach Cytochrom-c- Mutanten gesucht, da der Schwerpunkt der Untersuchungen auf den strukturgebundenen Atmungskettenkomponenten lag. Cytochrom c-Mutanten können nur durch den Benzidintest erkannt werden und sind

unter den atmungsdefekten Mutanten relativ selten. Sherman et al. (1965) fanden unter 10^6 untersuchten Kolonien nur 20 Cytochrom c-Mutanten. Eine Anreicherung mit TTC ist bei diesen Mutanten nicht möglich, da sie, obwohl unfähig auf Lactat zu wachsen, fast unverminderte Atmung aufweisen.

VI. 14. 3) Die pleiotropen Effekte

Der bezüglich ihrer pleiotropen Effekte bisher am besten beschriebene Mutantentyp ist derjenige des ρ^- -Mutantes bei Bäckerhefe. Der Verlust ihrer strukturgebundenen Cytochrome ist wohl darauf zurückzuführen, daß diese Mutante keine mitochondriale Proteinsynthese mehr besitzt und daher bestimmte Untereinheiten dieser Cytochrome nicht mehr synthetisiert werden können. Der Ausfall der strukturgebundenen Cytochrome könnte auch für die karyotischen RD-Mutanten mit Verlust der mitochondrialen Proteinsynthese aufgrund einer karyotischen Mutation erklärt werden. In diesem Punkt jedoch besteht große Uneinigkeit. Subik et al. (1970) fanden, daß Mutanten mit einer einzigen Cytochromdefizienz noch zur mitochondrialen Proteinsynthese fähig sind, während Mutanten mit mehreren Cytochromdefizienzen diese Befähigung nicht mehr besitzen. Im Gegensatz dazu stehen die Befunde von Ebner et al. (1973a), deren RD-Mutanten alle mitochondriale Proteinsynthese zeigen, gleichgültig, ob ein oder mehrere Cytochrome fehlen. Eine Erklärung für diese Diskrepanz wäre darin zu suchen, daß Subik die Proteinsynthese an isolierten Mitochondrien bestimmte; es ist möglich, daß die fragilen Mitochondrien pleiotroper Mutanten selektiv bei der Präparation geschädigt werden.

Subik et al. (1972) untersuchten eine Doppelmutante, welche sie durch Kreuzung zweier Mutanten erhielten, von denen die

eine defekt in Cytochrom a, die andere defekt in Cytochrom b, beide aber zur mitochondrialen Proteinsynthese befähigt waren. Diese Doppelmutante, obwohl phänotypisch identisch mit der oben beschriebenen pleiotropen Einfachmutante, zeigte normale mitochondriale Proteinsynthese. Die Autoren schlossen daraus, daß der primäre Defekt der beiden Mutanten, welche durch je eine Mutation cytochrom a- und -b- defizient geworden waren, ihre Unfähigkeit ist, ein Protein zu synthetisieren, das den Zusammenbau (assembly) der Atmungskettenbestandteile bewerkstelligt. Eine Möglichkeit der Erklärung für die Vielfalt der pleiotropen Effekte wären also Mutationen, die den Ausfall verschiedener "Organizer"- Proteine zur Folge haben, welche am Aufbau der mitochondrialen Innenmembran beteiligt sind. Dennoch bleibt ein Ausfall der mitochondrialen Proteinsynthese als Erklärungsmöglichkeit für das Fehlen der strukturgebundenen Cytochrome bestehen.

Andere Erklärungen, etwa die Bildung abnormaler Phospholipide, welche den Einbau von Atmungskettenbestandteilen in die Innenmembran stören oder verhindern können, sind nicht auszuschließen.

Eine Vielfalt von Erklärungsmöglichkeiten ergeben sich für Mutanten, die sich durch den Verlust aller Cytochrome auszeichnen, wie etwa die Mutante UV 67 von Schizosaccharomyces. Eine Mutante gleichen Phänotyps wurde bereits von Sugimura et al. (1965) und Miyake und Sugimura (1968) beschrieben. Die Autoren diskutieren, daß die Unfähigkeit zur Cytochrombildung in einer Störung der Häm-synthese, eventuell des Einbaus von Eisen in das Porphyrin zu suchen ist.

Störungen der Cytochromsynthese können sehr früh, angefangen von der Umformung der δ -Aminolävulinsäure zum Porphobilionogen, während der Umwandlungen zum Koproporphyrin oder später in der Ausbildung der spezifischen Hämgruppen (a, b und c) liegen. Je nach Lage des Blocks wären dann alle oder nur ein Teil der Cytochrome betroffen.

Mangelnde Funktionsfähigkeit der übrigen Komplexe aufgrund einer mutativen Veränderung eines Atmungszyklus läßt sich auch durch die enge strukturelle Bindung der einzelnen Atmungskettenkomponenten in der Innenmembran erklären. Mutanten mit vielen Defizienzen weisen oft eine veränderte Morphologie der Mitochondrien auf. Es ist bisher auch nicht möglich, den Komplex II der Atmungskette zu präparieren, ohne Komplex III zu zerstören. Es ist also durchaus denkbar, daß geringe Störungen in einem so hochorganisierten Verband wie der mitochondrialen Innenmembran, die Funktion der Atmungskette stark beeinflussen.

Allgemein erschweren diese pleiotropen Effekte die gezielte biochemische und genetische Arbeit über bestimmte Atmungskettenenzyme und ihrer Codierung. So kann selbst für die bisher am wenigsten pleiotropen Mutanten der Cytochromoxidase (Ebner et al., 1973b) nicht entschieden werden, ob die Ursache der Cytochrom-Defizienz eine Mutation eines Strukturgens für Cytochromoxidase oder eines Regulatorgens für den Zusammenbau (assembly) ist.

VI. 14. 4) Die Mutante UV 119 von Schizosaccharomyces pombe

Beispiel einer Mutante, welche spektral nur eine einzige Cytochromdefizienz zeigt, ist die Mutante UV 119, der das Cytochrom b_{565} fehlt. Diese Mutante wurde von Bandlow et al. (1973) näher untersucht, wobei sich zahlreiche pleiotrope Effekte zeigten:

- a) Mitochondrien dieser Mutante veratmen NADH und Succinat mit etwa 8 % der Wildtypaktivität und oxidieren Ascorbat zu etwa 60 % verglichen mit dem Wildtyp. Beide Reaktionen sind durch KCN weniger gehemmt als im Wildtyp.
- b) Der Cytochromgehalt (mit Ausnahme von b_{505}) und das Verhältnis von $aa_3 : c_1$ ist normal.
- c) Die b- Cytochrome werden durch NADH kaum reduziert. Die CoQ- Cytochrom c- Reduktase- Aktivität ist sehr niedrig, die Succinat-oxidation kann durch PMS stark gesteigert werden.
- d) AA hemmt weder NADH- noch Succinat-oxidation und bindet nicht an mitochondriale Partikel.
- e) Cytochrom b reagiert im Unterschied zum Wildtyp mit CO
- f) Die Mutante zeigt veränderte Schwefeleisenproteine.
- g) Komplex IV zeigt veränderte Kupferproteine, die Cytochrom-oxidase ist KCN- insensitiv.
- h) Die Mutante besitzt geringere ATPase- Aktivität, welche jedoch immer noch oligomycin- sensitiv ist.

UV 119 ist bis jetzt die RD- Mutante von Schizosaccharomyces mit den geringsten pleiotropen Effekten, da es sich bei den von Heslot et al. (1970) und Goffeau et al. (1972) um stark pleiotrope Mutanten handelt. Die wichtigsten Eigenschaften dieser Mutanten sind in Tab. 17 zusammengefaßt. Ziel weiterer Arbeit ist es, Cytochrommutanten mit möglichst wenig pleiotropen Effekten zu isolieren. Solche Mutanten müssen auch außerhalb der Gruppe gesucht werden, welche die Fähigkeit auf Glycerin zu wachsen verloren hat, etwa unter Resistenzmutanten gegen Atmungsgifte und Metallsalze. So fanden Foury und Goffeau (1972) unter den cobaltresistenten Mutanten solche, deren Atmungsenzyme weniger

(COB 6) oder stärker (COB 5) von der Glucoserepression betroffen sind. Mutanten dieser Art eröffnen sicher neue Wege zur Erforschung der Regulation und genetischen Steuerung der Atmungskette.

VI. 15) Literaturverzeichnis zum Abschnitt "Ergebnisse VI"

Albracht, S. P. J.; Oosterhout, H. van; Slater, E. C.:

On the link between succinate dehydrogenase and the cytochrome chain. In: The non- heme portion of the mitochondrial respiratory chain. Dissertation von S. P. J. Albracht, Amsterdam, (1972a)

Albracht, S. P. J.; Heerikhuizen, H. van; Slater, E. C.:

Iron- sulphur proteins in the succinate oxidase system. Biochim. Biophys. Acta 250, 1- 13, (1972a)

Amahi, M.; Sai, T.: Some aspects of (-)- citramalic acid accumulation by respiration- deficient mutants of yeast. Antonie van Leeuwenhoek 35, Supplement: Yeast symposium 1969, G 15- G 16, (1969)

Avers, C. J.; Pfeffer, C. R.; Rancourt, M. W.: Acridine induction of different kinds of "petite" mitochondria populations in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 90, 481- 494, (1965)

Bandlow, W.; Wolf, K.; Kaudewitz, F.; Slater, E. C.: Characterization of a mutant of *Schizosaccharomyces pombe* lacking cytochrome b- 565. (1973 in Vorbereitung)

Berden, J. A.; Slater, E. C.: The reaction of antimycin with a cytochrome b preparation active in reconstitution of the respiratory chain. Biochim. Biophys. Acta 216, 237- 249, (1970)

Berden, J. A.; Slater, E. C.: The allosteric binding of antimycin to cytochrome b in the mitochondrial membrane. Biochim. Biophys. Acta 250, 199 - 215, (1972)

Chance, B.; Wilson, D. F.; Dutton, P. L.; Erecińska, M.: Energy- coupling mechanism in mitochondria: kinetic, spectroscopic, and thermodynamic properties of an energy-transducing form of cytochrome b. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 66, 1175- 1186, (1970)

Chen, S. Y.: Contribution à l'étude génétique des mutants à déficience respiratoire chez la levure de boulangerie. Thèse, Paris, (1950)

- Chen, S. Y.; Ephrussi, B.; Hottinguer, H.: Nature génétique des mutants à déficience respiratoire de la souche B- II de la levure de boulangerie. *Heredity* 4, 337- 351, (1950)
- Claisse, M. L.: Studies on cytochrome system of yeasts: purification and spectral properties of *Schizosaccharomyces pombe* cytochrome c. *Antonie van Leeuwenhoek* 35, Supplement: Yeast symposium 1969, I 21- I 22, (1969)
- Dutton, P. L.; Erecinska, M.; Sato, N.; Mukai, Y.; Pring, M.; Wilson, D. F.: Reactions of b- Cytochromes with ATP and Antimycin A in pigeon heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 267, 15- 24, (1972)
- Ebner, E.; Menucci, L.; Schatz, G.: Mitochondrial assembly in respiration- deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Effects of nuclear mutations on mitochondrial protein synthesis. (1973a, im Druck)
- Ebner, E.; Mason, T. L.; Schatz, G.: Mitochondrial assembly in respiration- deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. II. Effects of nuclear and extrachromosomal mutations on the formation of cytochrome c oxidase. (1973, im Druck)
- Ephrussi, B.: Action de l'acriflavine sur les levures. In: Unités biologiques douées de continuité génétique. Edition du C. N. R. S., Paris 1949, 165- 180, (1949)
- Ephrussi, B.: Cytoplasmic heredity in yeasts. In: Nucleo- cytoplasmic relations in microorganisms. Oxford, at the Clarendon Press, 13- 50, (1953)
- Ephrussi, B.; Chimenes, A. M.: Actions de l'acriflavine sur les levures. I. La mutation "petite colonie". *Annales de l'Institut Pasteur* 76, 351-364, (1949)
- Erecinska, M.; Wilson, D. F.: Kinetic studies on cytochrome b- c₁ interaction in the isolated succinate- cytochrome c reductase. *FEBS Letters* 24, 269- 272, (1972)
- Foury, F.; Goffeau, A.: Glucose superrepressed and derepressed respiratory mutants in a "petite- negative" yeast: *Schizosaccharomyces pombe* 972h⁻. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 153- 160, (1972)

- Goffeau, A.; Colson, A. M.; Landry, Y.; Poury, F.: Modifications of mitochondrial ATPase in chromosomal respiratory- deficient mutants of a "petite- negative" yeast: *Schizosaccharomyces pombe* 972h⁻. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 1448- 1454, (1972)
- Gordon, P.; Steward, P.: Ubiquinone formation in wild- type and petite yeast: the effect of catabolite repression. *Biochim. Biophys. Acta* 177, 358- 360, (1969)
- Grimme, L. H.: Cytochrom b_T. *Naturwissenschaftliche Rundschau* 25, 473- 474, (1972)
- Hare, J. F.; Crane, F. L.: A duroquinone oxidation site in the mitochondrial transport chain. *Bioenergetics* 2, 317- 326, (1971)
- Hatefi, Y.; Haavik, A. G.; Griffiths, D. E.: Reconstitution of the electron transport system. I. Preparation and properties of the interacting enzyme complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, 441- 446, (1961)
- Hatefi, Y.; Hanstein, W. G.: On energy conservation and transfer in mitochondria. *Bioenergetics* 3, 129- 136, (1972)
- Heslot, H.; Louis, G.; Goffeau, A.: Segregational respiratory- deficient mutants of a "petite- negative" yeast *Schizosaccharomyces pombe* 972h⁻. *J. Bacteriol.* 104, 482- 491, (1970)
- Heyman- Blanchet, T.: Action de différents agents réducteurs sur le spectre, à basse température, de fractions sub-cellulaires de levure. *Biochim. Biophys. Acta* 78, 762- 764, (1963)
- Hirsch, H. M.: A comparative study of aconitase, fumarase, and DPN- linked isocitric dehydrogenase in normal and respiration- deficient yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 9, 674- 686, (1952)
- Jakovcic, S.; Getz, G. S.; Rabinowitz, M.: Phospholipid content of normal and respiratory- deficient yeast. In: *Biochemical aspects of the biogenesis of mitochondria*. E. Slater et al. eds., Adriatica Editrice, Bari, Italien, 487- 489, (1968)

- Kadenbach, B.: Biosynthesis of mitochondrial enzymes.
FEBS Symposium 17, 179- 188, (1969)
- Keilin, D.: Cytochromes and respiratory enzymes. Proc. Roy.
Soc., B. 104, 206- 252, (1929)
- Keilin, D.: The history of cell respiration and cytochrome.
Cambridge, at the University Press, (1966)
- Kok, J. de: A succinate dehydrogenase- deficient yeast mutant.
8th FEBS Meeting, Amsterdam 1972, Abstract 613
- Kovac, L.; Groot, G. S. P.; Racker, E.: Translocation of pro-
tons and potassium ions across the mitochondrial membrane
of respiring and respiration- deficient yeast. Biochim.
Biophys. Acta 256, 55- 65, (1972)
- Kovac, L.; Subik, J.; Russ, G.; Kollar, K.: On the relation-
ship between respiratory activity and lipid composition
of the yeast cell. Biochim. Biophys. Acta 144, 94- 101,
(1967)
- Kovac, L.; Weissová, K.: Oxidative phosphorylation in yeast.
III. ATPase activity of the mitochondrial fraction from a
cytoplasmic respiratory- deficient mutant. Biochim. Bio-
phys. Acta 153, 55- 59, (1968)
- Kovachevich, R.: Comparison of oxidation rates of reduced
pyridine nucleotides by normal and respiration deficient
mutant yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, 48-53,
(1964)
- Mackler, B.; Douglas, H. C.; Will, S.; Hawthorne, D. C.;
Mahler, H. R.: Biochemical correlates of respiratory de-
ficiency. IV. Composition and properties of respiratory
particles from mutant yeasts. Biochemistry 4, 2016- 2020,
(1965)
- Mahler, H. R.; Neiss, G.; Slonimski, P. P.; Mackler, B.:
Biochemical correlates of respiratory deficiency.
III. The level of some unsaponifiable lipids in different
strains of baker's yeast. Biochemistry 3, 893- 895, (1964)

- Margoliash, E.; Schejter, A.: Cytochrome c. Advances in protein chemistry 21, 113- 286, (1966)
- McClary, D. O.; Bowers, W. D.: Mitochondrial changes accompanying acridine- induced petite mutation in *Saccharomyces fragilis*. J. Ultrastruct. Res. 25, 37- 45, (1968)
- Miyake, S.; Sugimura, T.: Coproporphyrinogenase in a respiration- deficient mutant of yeast lacking all cytochromes and accumulating coproporphyrin. J. Bacteriol. 90, 1997- 2003, (1968)
- Muraoka, S.; Okada, M.: Reduction and oxidation of longer- wavelength cytochrome b (b 566) in rat liver mitochondria under the influence of external oxidants. Biochim. Biophys. Acta 283, 36- 41, (1972)
- Myer, Y. P.; King, T. E.: Conformational evidence for the non- identity of cytochromes a and a₃ in cytochrome oxidase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 34, 170- 172, (1969)
- Nelson, B. D.; Norling, B.; Persson, B.; Ernster, L.: Influence of ubiquinone on the rate of antimycin binding to submitochondrial particles. Biochim. Biophys. Acta 267, 205- 210, (1972)
- Paléus, S.: The cytochromes c. Bull. Soc. Chim. Biol. 49, 917- 933, (1967)
- Perlman, P. S.; Mahler, H.: Formation of yeast mitochondria. III. Biochemical properties of mitochondria isolated from a cytoplasmic petite mutant. Bioenergetics 1, 113- 138, (1970)
- Rieske, J. S.: Changes in oxidation- reduction potential of cytochrome b observed in the presence of antimycin A. Arch. Biochem. Biophys. 145, 179- 193, (1971)
- Rieske, J. S.; Zaugg, W. S.: The inhibition by antimycin A of the cleavage of one of the complexes of the respiratory chain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 8, 421- 426, (1962)
- Sai, T.; Amaha, M.: Accumulation of (-)- citramalic acid by respiration- deficient mutants of brewer's yeast. J. Gen. Appl. Microbiol. 11, 355- 365, (1965)

- Sai, T.; Amaha, M.: Studies on (-)- citramalic acid formation by respiration- deficient yeast mutants. II. Citramalic acid formation in a variety of respiration- deficient mutants of brewer's, baker's, sake and wine yeasts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13, 15- 23, (1967)
- Sato, N.; Ohnishi, T.; Chance, B.: Spectral study of b cytochromes in yeast mitochondria and intact cells. *Biochim. Biophys. Acta* 275, 288- 297, (1972)
- Sato, N.; Wilson, D. F.; Chance, B.: The spectral properties of the b cytochromes in intact mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 253, 88- 97, (1971)
- Sherman, F.; Slonimski, P. P.: Respiration- deficient mutants of yeast. II. Biochemistry. *Biochim. Biophys. Acta* 90, 1- 15, (1964)
- Sherman, F.; Taber, H.; Campbell, W.: Genetic determination of iso- cytochromes c in yeast. *J. Molec. Biol.* 13, 21- 39, (1965)
- Slater, E. C.: Mitochondrial cytochromes b and their possible role in energy conservation. In: Mechanisms in bioenergetics. G. F. Azzone, L. Ernster, S. Papa, E. Quagliariello, eds., Academic Press, New York- London, 405- 431, (1973)
- Slonimski, P. P.: Effet de l'oxygene sur la formation de quelques enzymes chez le mutant "petite colonie" de *Saccharomyces cerevisiae*. *C. R. Acad. Sci. Paris* 231, 375- 376, (1950)
- Slonimski, P.: Mutation et adaptation dans la formation des enzymes respiratoires chez la levure. *Bulletin de la societe francaise de physiologie vegetale* 4, 125- 131, (1958)
- Slonimski, P. P.; Acher, R.; Péré, G. Sels, A.; Somlo, M.: Elements du système respiratoire et leur régulation: cytochromes et iso- cytochromes. In: Regulation chez les micro-organismes. Editions du C. N. R. S. Paris, 435- 461, (1965)
- Slonimski, P. P. ; Ephrussi, B.: Action de l'acriflavine sur les levures. V. Le système des cytochromes des mutants "petite colonie". *Annales de l'Institut Pasteur* 77, 1- 17, (1949)

- Slonimski, P. P.; Hirsch, H. M.: Nouvelles données sur la constitution enzymatique du mutant "petite colonie" de *Saccharomyces cerevisiae*. C. R. Acad. Sci. Paris 235, 741- 743, (1952)
- Smith, L.: Spectrophotometric assay of cytochrome oxidase. In: Methods of biochemical analysis. D. Glick ed., 427- 434, (1954)
- Smith, D. G.; Marchant, R.; Naroudas, N. G.; Wilkie, D.: A comparative study of the mitochondrial structure of petite strain of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 56, 47- 54, (1969)
- Strong, F. M.; Dewey, R. S.; Lovmans, M. E.; Dickie, J. P.; Tamelen, E. E.: The chemistry of antimycin A. J. Am. Chem. Soc. 83, 1639, (1961)
- Subik, J.; Kovac, L.; Kolarov, J.: Oxidative phosphorylation in yeast. X. Phosphorylation ability of mutants deficient in cytochromes a and b. Biochim. Biophys. Acta 283, 146- 154, (1972)
- Subik, J.; Kuzela, S.; Kolarov, J.; Kovac, L.; Lachowicz, T. M.: Oxidative phosphorylation in yeast. II. ATPase activity and protein synthesis from nuclear mutants deficient in cytochromes. Biochim. Biophys. Acta 205, 513- 519, (1970)
- Sugimura, T.; Okabe, K.; Nagao, M.; Gunge, N.: A respiration-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* which accumulates porphyrins and lacks cytochromes. Biochim. Biophys. Acta 115, 267- 275, (1966)
- Taggart, W. V.; Sanadi, D. R.: Menadiol as an electron donor for reversed oxidative phosphorylation in submitochondrial particles. Biochim. Biophys. Acta 267, 439- 443, (1972)
- Tavlitzki, J.: Action de l'acriflavin sur les levures. III. Etude de la croissance des mutants "petite colonie". Annales de l'Institut Pasteur 76, 497 - 509, (1949)
- Verdière, J.; Lederer, F.: Présence de la ϵ N-triméthyllysine dans l'iso-1- et l'iso-2-cytochromes c synthétisés par des souches de levure à déficience respiratoire (q^-). FEBS Letters 19, 72- 74, (1971)

- Wikström, M. K. F.: Properties of three cytochrome b- like species in mitochondria and submitochondrial particles. *Biochim. Biophys. Acta* 252, 332- 345, (1971)
- Wilson, D. F.; Dutton, P. L.: Energy dependent changes in the oxidation- reduction potential of cytochrome b. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39, 59- 64, (1970)
- Wilson, D. F.; Erecińska, M.; Leigh, J. S., jr.; Koppelman, M.: The properties of the mitochondrial succinate- cytochrome c reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 151, 112- 121, (1972)
- Yaoi, Y.: Comparison of the primary structures of cytochromes c from wild and respiration - deficient mutant yeasts. *J. of Biochemistry* 61, 54- 58, (1967)
- Yoshikawa, S.; Oori, Y.: The inhibition mechanism of the cytochrome oxidase reaction. II. Classification of inhibitors based on their modes of action. *J. of Biochemistry* 71, 859- 872, (1972a)
- Yoshikawa, S.; Oori, Y.: The inhibition mechanism of the cytochrome oxidase reaction. III. Combined effects of inhibitors on cytochrome oxidase. *J. of Biochemistry* 71, 873- 876, (1972b)
- Yotsuyanagi, Y.: Etudes sur le chondriome de la levure. II. Chondriome des mutants à déficience respiratoire. *J. Ultrastruct. Res.* 7, 141- 160, (1962)
- Yu, C. A.; Yu, L.; King, T. E.: Spectral evidence of multiple cytochrome b present in succinate: cytochrome c reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 267, 300- 308, (1972)

VII. Weitere genetische Untersuchungen an atmungsdefekten

Mutanten von *Schizosaccharomyces pombe*: Reversion, Komplementation und Rekombination.

Die bisher dargestellten genetischen Analysen an atmungsdefekten Mutanten von *Schizosaccharomyces pombe* beschränkten sich darauf, Aussagen über den Vererbungsmodus der Atmungsdefizienz zu machen. Die beiden Methoden, mit denen cytoplasmatisch vererbte Deletionsmutanten ausgeschlossen werden konnten, waren sowohl Freisporanalyse als auch Tetradenanalyse im Rückkreuzungsverfahren. Für viele Mutanten wurde auch von ihren Enzymdefekten und spektralen Eigenschaften her eine extrakaryotische Mutation des ρ^- Typs ausgeschlossen. Im folgenden wurden unter anderem zwei weitere Eigenschaften dieser Mutanten geprüft, welche ρ^- Mutanten nicht besitzen, nämlich die Fähigkeit, zu revertieren und einander zu komplementieren.

VII. 1) Rückmutation und Reversion bei atmungsdefekten Mutanten von *Schizosaccharomyces pombe*

Im folgenden soll als Reversion die an einer Mutante zu beobachtende genetisch bedingte Rückkehr zum Phänotyp des Wildtyps verstanden werden. Die Aussage ist qualitativ, nicht aber quantitativ zu verstehen. Zur Gruppe der Reversionen gehören daher sowohl echte Rückmutanten wie auch Suppressormutanten. Diese Definition wurde gewählt, weil nicht beabsichtigt war, durch eine sehr zeitraubende und aufwendige Kreuzungsanalyse die einzelnen Reversionsmutanten einer der oben genannten beiden Gruppen zuzuordnen.

Die Untersuchung über Reversionen wurde, wie alle folgenden Untersuchungen, hauptsächlich an Mutanten der Cytochromoxidase ausgeführt, da spätere Experimente der Frage der Codierung und Struktur des mutativ veränderten Cytochroms aa_3 gewidmet sein sollen. Fernziel dieser vorbereitenden Untersuchungen über Revertanten von Cytochromoxidase-Mutanten ist es, in Anlehnung an die Untersuchungen von Parker und Sherman (1969) und Sherman et al. (1968) an Revertanten von Cytochrom c-Mutanten die Natur des Basenaustausches zu bestimmen und so diese Mutanten genetisch weiter zu charakterisieren. Die atmungsdefekten Mutanten von Schizosaccharomyces weisen unterschiedliche Reversionsfrequenzen auf, welche durch Plattieren von 10^8 Zellen einer frisch reisolierten Kultur auf Glycerinmedium bestimmt wurden. Als stark revertierend wurden solche bezeichnet, welche mehr als 50 - 100 Atmungskompetente/ 10^8 Zellen aufwiesen, relativ stabil wurden solche genannt, welche unter 10^8 Zellen maximal 1 - 5 Revertanten zeigten. Die auf ihre Stabilität hin untersuchten Mutanten sind aus Tab. 10 zu ersehen. Da atmungsdefekte Mutanten erhöhte Letalität zeigen, lassen sich spontane Revertanten leicht aus einer älteren Stammkultur isolieren. Ein Teil der in Tab. 11 aufgeführten Revertanten wurde so gewonnen, der andere nach Nitrosoguanidinmutagenese unter den in "Methoden" beschriebenen Bedingungen. Die Cytochromoxidasebildung beider Mutanten, von denen sich die Revertanten ableiten, ist fast (UV 1) oder gänzlich (NG 186) defekt. Sie weisen aber noch mittlere Aktivität der übrigen Komplexe auf. UV 1 R3 und UV 1 R8 zeigen Wildphänotyp, während sich unter den Revertanten von NG 186 keine einzige mit Wildtypaktivitäten befindet. Die Revertanten der UV 1 zerfallen wiederum in zwei Klassen, nämlich in solche, bei denen durch die Reversion nur die Cytochromoxidaseaktivität teilweise

oder ganz wiederhergestellt wurde und solche, bei denen auch die Aktivitäten der anderen Komplexe erhöht erscheinen. Revertanten dieser zweiten Klasse finden sich nicht unter den spontan entstandenen von NG 186. NG 186 R5, NG 186 R7 und NG 186 R8 stellen Suppressormutanten dar, deren zweiter Mutationsort mit dem ersten gekoppelt ist. (R5 : 16 %, R7 : 8% und R8 : 14 % Rekombinanten im Rückkreuzungsexperiment; siehe Tabelle 11)

Die Wirkung dieser Suppressoren auf andere Cytochromoxidase-mutanten soll später untersucht werden.

VII. 2) Genetische und biochemische Untersuchungen an einer
atmungsdefekten Doppelmutante

Bei Reversion einer cytochromoxidasedefekten Mutante können deren pleiotrope Effekte also erhalten bleiben oder teilweise aufgehoben werden. Eine andere Möglichkeit, die Wirkung solcher pleiotropen Effekte näher zu studieren, bietet sich durch die Untersuchung einer Doppelmutante. pet 226 ist eine Mutante, welche neben defekter Cytochromoxidase auch noch Defekte in Komplex III besitzt. Kreuzt man diese Mutante mit dem Wildtyp zurück, so erhält man neben der erwarteten Aufspaltung in 2 RC : 2 RD auch Tetraden mit vier atmungsdefekten Sporen. Kreuzt man diese 4 atmungsdefekten Sporen wieder mit dem Wildtyp zurück, so erhält man fast ausschließlich Aufspaltungen von 2 RC : 2 RD. Das bedeutet, daß jede dieser Sporen nur eine Mutation, die Mutante pet 226 aber zwei verschiedene Mutationen zur Atmungsdefizienz trägt. Eine schematische Darstellung dieser Kreuzungsanalyse ist in Fig. 77 gegeben, die Ergebnisse der Tetradenanalyse sind in Tab. 12 dargestellt.

An diesen Mutanten wurde untersucht, ob die phänotypische Manifestation beider Mutationen voneinander völlig unabhängig erfolgt oder sich gegenseitig beeinflusst. Verwendet man dazu die Nachkommen von Sporen eines Askus mit der Aufspaltung 2 RC : 2 RD, so zeigen 2 Sporen Wildtypaktivität für Succinat-Cytochrom c- Reduktase ohne und mit PMS und für Cytochromoxidase, die zwei anderen Sporen jedoch keine Aktivität für beide Tests (Askus 7 und Askus 14 in Tab. 12). Spore a und Spore b tragen also beide Mutationen, Spore c und Spore d die entsprechenden Wildtypallele. Askus 5 zeigt eine Aufspaltung von 4 RD : 0 RC. Alle vier Sporen sollten daher eine Mutation zur Atmungsdefizienz aufweisen.

Unter dem Einfluß der Mutation, welche den Komplex III beeinflusst, erreichen Spore a und Spore c nur 2 bzw. 1 % der Cytochromoxidase-aktivität des Wildtyps. Spore b und Spore d weisen, verursacht durch die den Komplex IV verändernde Mutation, nur etwa 50 % der Succinat-Cytochrom c- Reduktase- Aktivität auf, welche sich durch PMS nur auf etwa 84 % (Spore c und d von Askus 14 erreichen 100 %) steigern läßt. Zwischen beiden Mutationen bestehen also Wechselwirkungen: Durch die Anwesenheit einer Mutation für Komplex IV wird die Enzymaktivität in Komplex III beeinflusst und umgekehrt, obwohl die genetische Wildtypinformation für die Ausbildung des jeweiligen primär nicht betroffenen Komplexes vorhanden sein muß.

VII. 2) In vivo- Komplementation cytochromoxidase- defekter Mutanten

In Reversionskolonien atemungsdefekter karyotischer Mutanten tritt neben der Restauration des primären Defekts manchmal auch eine Kompensation der Sekundäreffekte auf. Im folgenden soll untersucht werden, ob sich zwei verschiedene cytochromoxidase- defekte Mutanten zu einer atemungskompetenten Diploiden vereinigen lassen. An dieser Diploiden soll wiederum zweierlei geprüft werden:

- 1.) Welche Aktivität und spektrale Eigenschaften besitzt die von der Diploiden gebildete Cytochromoxidase?
- 2.) Welche Aktivitäten besitzen die übrigen, durch pleiotrope Effekte betroffenen Komplexe in der Diploiden?

Mit Hilfe der Marker *ade7* und *his2* wurden für folgende Kombinationen atemungsdefekter Mutanten nach dem in "Methoden" ausführlich geschilderten Verfahren atemungskompetente Diploide selektiert: UV 1 + UV 26; UV 1 + UV 29, UV 7b + UV 26 und UV 7b + UV 29.

Bei Schizosaccharomyces sind Diploide, wie eingangs erwähnt, nur dann stabil, wenn sie bezüglich ihres Paarungstyps homozygot sind. Die Entstehungsmöglichkeiten solcher Diploider sind in Fig. 68 schematisch dargestellt. Das Zustandekommen stabiler Diploider durch Non-disjunction (1) kann wegen Fehlens geeigneter Außenmarker nicht geprüft und ausgeschlossen werden. Wahrscheinlicher ist die Entstehung solcher Diploider durch mitotisches crossing-over (2, 3 und 4). Die Benutzung von Markern, welche auf dem Paarungstypchromosom liegen zur Selektion bringt es mit sich, daß in den meisten Fällen alle Marker distal vom Paarungstyplocus (hier: *his2*) in der Diploiden homozygot vorliegen (da Cunha, 1970). Da unter den Diploiden nach Selektion auch Prototrophe zu finden sind, muß crossing-over zwischen *ade 7* und Paarungstyplocus stattgefunden haben (3a). Die Entstehung prototropher Diploider der Paarungstypkonfiguration h^+h^+ kann befriedigend nur durch zwei crossing-over erklärt werden. Da solche Diploide sehr selten beobachtet wurden, ist eine Reversion eines auxotrophen Markers während der Selektionsprozedur jedoch nicht auszuschließen. In Tab. 14 sind die Aktivitäten der Succinat- Cytochrom c- Reduktase ohne und mit PMS und der Cytochromoxidase für mehrere Isolate jeder Kombination aufgeführt (Proteinwerte Tab. 15).

Kombinationen der Mutante UV 1 (Cytochromoxidaseaktivität 1 %) mit UV 26 (0 %) und UV 29 (1 %) ergeben in der Diploiden rund 75 % der Wildtypaktivität und ebenfalls spektral nachweisbares Cytochrom aa_3 mit den gleichen Absorptionsbanden wie der Wildtyp. Die Aktivitäten für die Succinat- Cytochrom c- Reduktase ohne und mit PMS liegen für beide Diploide höher als

für die entsprechenden Haploiden, was wiederum eine pleiotrope Wirkung der Restauration eines Defektes auf andere Teile der Atmungskette demonstriert, wie sie für die Reversion gefunden wurde.

Kombination von UV 7b, einer Mutante mit Cytochrom aa_3 - Spektrum, jedoch fast ohne Cytochromoxidase- Aktivität mit UV 26 und UV 29 ergibt etwa 05 % der Wildtypaktivität, jedoch für die übrigen Enzyme nur Aktivitäten, welche zwischen denen für die Haploiden liegen. Die Spektren aller Isolate zeigen die Absorptionsbanden für aa_3 (Fig. 71 und 72). Zur Kontrolle wurden mehrere Isolate jeder Kombination durch p- Fluorphenylalanin haploidisiert, wobei wieder atmungsdefekte Kolonien auftraten (Gutz, 1966). Diese quantitative Komplementationsanalyse eröffnet neue Wege zum Studium der Regulation innerhalb der Atmungskette und der Erforschung der pleiotropen Effekte.

VII. 4) Alleliebeziehungen unter atmungsdefekten Mutanten

Die enzymatischen und spektralen Untersuchungen der atmungsdefekten Mutanten von Schizosaccharomyces zeigen, daß die Gruppe der atmungsdefekten Mutanten aus einer großen Zahl verschiedener Typen zusammengesetzt ist. Betrachtet man die Verteilung der Mutationen zur Atmungsdefizienz auf der Chromosomenkarte von Saccharomyces cerevisiae (Fig. 12), so findet man diese über das ganze Genom verteilt. Im folgenden soll eine ungefähre Vorstellung von der Verteilung und Vielfalt der Mutationen zur Atmungsdefizienz bei Schizosaccharomyces gegeben werden.

Atmungsdefekte Mutanten verschiedenster Typen wurden mit dem Wildtyp rückgekreuzt und daraus RD- Mutanten entgegenge-

setzten Paarungstyps reisoliert. Wie in Fig. 73 dargestellt, wurden Ausstriche der Mutanten entgegengesetzten Paarungstyps auf Malzmedium übereinandergestempelt und nach Bebrütung auf Glycerinmedium abgedrückt. Auf den Überkreuzungsstellen wachsen atmungsdefekte Rekombinanten, die dazwischenliegenden Regionen dienen zur Abschätzung der Reversionsrate. Mutanten, welche auf verschiedenen Chromosomen liegen oder auf ein und demselben Chromosom nur schwach gekoppelt sind, zeigen starkes Wachstum, allele oder eng gekoppelte Mutanten kein oder nur geringes Wachstum auf Glycerin. Bei Analyse der in Tab. 16 aufgetragenen Rekombinationswerte zeigt sich, daß die Mehrzahl der Mutanten untereinander nicht oder sehr schwach gekoppelt ist. Dies beweist, daß auch bei Schizosaccharomyces sehr viele verschiedene Gene für die Atmungsdefizienz verantwortlich sein müssen. Qualitative Rekombinationsanalysen der Mutantenpaare, welche hier schwache Rekombination aufweisen, ergaben Rekombinationswerte von 5 - 20 Atmungskompetenten/ 100 Askosporen. Eine Kopplung von 3 oder mehr Mutationen zeigte sich bei zahlreichen Stichproben, wobei die Rekombinationshäufigkeiten etwa 1 - 30 Rekombinanten/100 Askosporen betrugen. Die Gruppen selbst waren ungekoppelt oder nur schwach gekoppelt.

Das Fehlen geeigneter Marker auf allen Chromosomen von Schizosaccharomyces macht eine Zuordnung dieser verschiedenen Cluster zu einzelnen Kopplungsgruppen derzeit unmöglich, doch läßt sich aus der Vielzahl der Gruppen von atmungsdefekten Mutanten schließen, daß diese ähnlich wie bei Saccharomyces wohl über das gesamte Genom verteilt sind.

Für eine weitere genetische Analyse wurden 26 Mutanten ausgewählt, welche alle keine oder sehr wenig Cytochromoxidase-

Aktivität aufwiesen. Trotz Beschränkung auf eine Mutantengruppe ergab sich ein ähnliches Bild. Aus den in Fig. 74 dargestellten Rekombinationswerten geht hervor, daß 10 Mutanten in allen Kombinationen starke Rekombination aufweisen, also schwach oder überhaupt nicht gekoppelte Mutationsorte tragen. Möglichkeiten einer weiteren Einengung der Phänotypen und Fortführung der Kreuzungsanalysen sollen anschließend diskutiert werden.

VII. 5) Zusammenfassung

- 1.) Für zwei cytochromoxidasedefekte Mutanten werden Revertanten beschrieben. Durch die Reversion kann die Oxidasedefizienz allein oder auch die pleiotropen Effekte betroffen sein.
- 2.) Im Rückkreuzungsverfahren werden die 2 Mutationen einer Doppelmutante getrennt und die pleiotropen Wirkungen der Einzelmutationen untersucht.
- 3.) An einigen Beispielen wird gezeigt, daß zwei in einer Diploiden vereinigte cytochromoxidasedefekte Mutanten funktionsfähige Cytochromoxidase bilden können. Die pleiotropen Effekte können in der Diploiden vermindert sein.
- 4.) Die Atmungsdefizienz wird bei Schizosaccharomyces wie auch bei Saccharomyces durch Mutationen in zahlreichen ungekoppelten oder schwach gekoppelten Genen hervorgerufen.
- 5.) Zur Cytochromoxidasedefizienz führen Mutationen in mindestens 10 verschiedenen Genorten.

VII. 6) Diskussion

Eiser et al. (1973a) isolierten bei Saccharomyces 15 Atmungsdefekte Mutanten, welche entweder nur cytochrom aa₃- defekt waren oder pleio-

trope Effekte zeigten. Die Komplementationsanalyse ergab die Zugehörigkeit zu sieben verschiedenen Komplementationsgruppen. Nur zwei der Mutanten erwiesen sich als allel mit dem Testerstamm pet 5 von Sherman; die übrigen 16 zeigten Komplementation mit einer Serie von mehreren Testerstämmen. Es ist wahrscheinlich, daß sich bereits unter dieser geringen Anzahl Mutanten neue, bisher noch nicht beschriebene, finden. Aufgrund der Vielzahl der Atmungskettenbestandteile und der vorher besprochenen Möglichkeiten funktionsunfähiger Integrationsproteine wächst die Anzahl potentieller Mutationen zur Atmungsdefizienz ins Uferlose.

Auch die elf Cytochromoxidasemutanten ohne pleiotrope Effekte von Ebner et al. (1972b) verteilen sich wiederum auf 5 Komplementationsgruppen. Da in den hier dargestellten Untersuchungen an Schizosaccharomyces auch pleiotrope Mutanten der Cytochromoxidase einbezogen wurden, liegt die Anzahl der Gene, welche für Cytochromoxidasedefizienzen verantwortlich sind, natürlich höher.

In zukünftigen Untersuchungen muß nach Mutanten gesucht werden, welche möglichst wenig pleiotrope Effekte besitzen. Die Ergebnisse von Ebner et al. (1972b) an Saccharomyces lassen hoffen, daß auch bei Schizosaccharomyces solche Mutanten gefunden werden können, besonders da hier die Mutantensuche nicht durch sekundär auftretende ρ^- Mutanten in den karyotischen Atmungsdefekten erschwert wird. Eine Einschränkung bleibt auch dann bestehen: es kann gegenwärtig nicht entschieden werden, ob eine Mutation zur Cytochromoxidasedefizienz die Synthese einer bestimmten Untereinheit dieses Enzyms oder die Integration dieses Bestandteils verhindert.

Es ist sicher lohnend, diese Untersuchungen an Mutanten der Cytochromoxidase, wie sie von Ebner an Saccharomyces cerevisiae begonnen wurden, parallel dazu an Schizosaccharomyces pombe

zu führen. Da die Cytochromoxidase ein teilweise mitochondrial synthetisiertes Enzym ist (Weiss et al., 1971; Mason et al., 1973), ergeben vielleicht solche Untersuchungen an Schizosaccharomyces Aufschluß über den Beitrag der Mitochondrien zur Proteinsynthese bei petite- negativen Hefen.

VII. 7) Literaturverzeichnis zum Abschnitt "Ergebnisse VII"

- da Cunha, M. F.: Mitotic mapping of *Schizosaccharomyces pombe*.
Genet. Res., Camb. 16, 127- 144, (1970)
- Ebner, E.; Mennucci, L.; Schatz, G.: Mitochondrial assembly in
respiration- deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.
I. Effect of nuclear mutations on mitochondrial protein
synthesis. (1973, im Druck)
- Ebner, E.; Mason, T. L.; Schatz, G.: Mitochondrial assembly
in respiratory- deficient mutants of *Saccharomyces cere-*
visiae. II. Effect of nuclear and extrachromosomal mutations
on the formation of cytochrome c oxidase. (1973, im Druck)
- Gilmore, R. A.; Stewart, J. W.; Sherman, F.: Amino acid re-
placements resulting from super- suppression of nonsense
mutants of iso- 1- cytochrome c from yeast. J. Molec. Biol.
61, 157- 173, (1971)
- Gutz, H.: Induction of mitotic segregation with p- fluor-
phenylalanine in *Schizosaccharomyces pombe*.
J. Bacteriol. 92, 1567- 1568, (1966)
- Mason, T. L.; Poyton, R. O.; Wharton, D. C.; Schatz, G.:
Cytochrome c oxidase from baker's yeast.
J. Biol. Chem. 248, 1346 - 1354, (1973)
- Parker, J. H.; Sherman, F.: Fine- structure mapping and mu-
tational studies of gene controlling yeast cytochrome c.
Genetics 62, 9- 22, (1968)
- Weiss, H.; Sebald, W.; Bücher, T.: Cycloheximide resistant
incorporation of amino acids into a polypeptide of the
cytochrome oxidase of *Neurospora crassa*. Eur. J. Biochem.
22, 19- 26, (1971)

S C H L U S S D I S K U S S I O N

Petites in einer "petite- negativen" Hefe?

Bulder's Klassifizierung der Hefen in eine petite- positive und eine petite- negative Gruppe bedeutet, wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, nicht unbedingt, daß es völlig unmöglich ist, atmungsdefekte Mutanten von einer petite- negativen Hefe zu erhalten. Atmungsdefekte Mutanten konnten auch in anderen petite- negativen Hefen wie Saccharomyces lactis (Herman und Griffin, 1968) induziert werden. Alle bisher getesteten atmungsdefekten Mutanten an petite- negativen Hefen sind höchstwahrscheinlich karyotisch vererbt (Foury und Goffeau, 1972; Goffeau et al., 1972; Herman und Griffin, 1968; Heslot et al., 1970). Aufgrund der Möglichkeit, auch bei petite- negativen Hefen petite- Mutanten zu erhalten, erscheint es sinnvoller, zwischen rho⁻ petite- negativ und absolut petite- negativ zu unterscheiden. Die absolut petite- negativen Hefen wie Saccharomyces fragilis vermögen nicht unter anaeroben Bedingungen zu wachsen (de Deken, 1961, 1966; McClary und Lowers, 1966) und zeigen keine Repression der Bildung mitochondrialer Atmungskettenenzyme durch Glucose. Auch hier weicht Schizosaccharomyces pombe in seinem Verhalten stark von der Gruppe der absolut petite- negativen Hefen ab. Der Atmungsquotient ist für Schizosaccharomyces unter Glucoserepression ebenso hoch wie in reprimierten petite- positiven Hefen (Heslot et al., 1970). Auch wurden bei Schizosaccharomyces Mutanten gefunden, welche stärker oder weniger stark der Glucoserepression unterliegen als der Wildtyp (Foury und Goffeau, 1972). Die Glucoserepression ist jedoch

etwas atypisch bei Schizosaccharomyces, da die Atmung nicht in dem Maße zunimmt wie die Glucosekonzentration abnimmt: die Atmung wird intensiver noch bevor die Glucosekonzentration signifikant abfällt und steigt weiter an, wenn die Glucose bereits verbraucht ist. Die Verallgemeinerung, daß petite- negative Hefen nicht anaerob wachsen können (Bulder, 1964ab) trifft auch für Schizosaccharomyces nicht zu. Unter bestimmten Bedingungen (Heslot et al., 1970) kann Schizosaccharomyces unter anaeroben Bedingungen etwa 14 Generationen wachsen.

Eine interessante Eigenschaft teilt Schizosaccharomyces mit anderen petite- negativen Hefen: die Entstehung von atmungsdefekten Mikrokolonien nach Ethidiumbromid- oder Akriflavinbehandlung (Heslot et al., 1970; Schwab et al., 1971; Trenina et al., 1965). Läßt man Schizosaccharomyces längere Zeit in ethidiumbromidhaltigem Medium wachsen, so erhält man nach Ausplattieren auf Glucosemedium Mikrokolonien. Durch parallele Ausplattierung auf Glycerinmedium kann gezeigt werden, daß diese Zellen nach Ethidiumbromidbehandlung nicht mehr atmungsfähig sind. Diese "phänotypischen petites" können wieder zur Atmungskompetenz "revertieren", wobei eine Abhängigkeit der "Erholungszeit" von Einwirkungsdauer und Konzentration des Ethidiumbromid besteht.

Den gleichen Effekt der Entstehung phänotypischer petites fanden Luha et al. (1971) bei der petite- negativen Hefe Kluyveromyces lactis. Nach Behandlung der Zellen mit Ethidiumbromid, Acriflavin und Nalidixinsäure konnte biochemisch keine mitochondriale DNS mehr nachgewiesen werden. Nach Wachstum in hemmstoff- freiem Medium erreichten die Zellen wieder den normalen Gehalt an mitochondrialer DNS. Dasselbe Phänomen beobachtete Nagai (1969) bei den

petite- negativen Hefen Saccharomyces logos und Saccharomyces rosei nach Behandlung mit den Carcinogenen 4- Nitrochinolin 1- oxid und Nitrosoguanidin. Der Autor erhielt 5 - 20 % atmungsdefekte Kolo-nien, welche nach einiger Zeit revertierten. Dieses für die petite- negativen Hefen beschriebene Stadium des pseudo- petite- Zustan-des wird auch bei Saccharomyces cerevisiae (Perlman und Mahler, 1971) gefunden. Eine Reversion dieses Zustandes kann durch Erhöhung der Temperatur auf 45° C erfolgen.

Worin sind nun die Gründe zu suchen, daß nach Ethio-diumbromidbehandlung bei petite- positiven Hefen stabile cytoplas-matisch vererbte atmungsdefekte Mutanten entstehen (Slonimski et al., 1968), während dieselbe Behandlung für petite- negative He-fen letal ist? Sicherlich ist nicht der Verlust der strukturge-bundenen Atmungskettenenzyme an sich, wie er bei rho⁻- Mutanten zu finden ist, in petite- negativen Hefen der Grund der letalen Wir-kung (Herman und Griffin, 1968), da bei Schizosaccharomyces at-mungsdefekte Mutanten mit weitaus größeren Cytochromdefizienzen lebensfähig sind. Andere Möglichkeiten letaler Folgen der rho⁻- Mutation in petite- negativen Hefen wie Defekte der Lipidsynthese oder Ausfall einiger Zitronensäurezyklusenzyme, wie sie von Her-mann und Griffin diskutiert werden, sind ebenfalls kaum als Ursache der Letalität der rho⁻- Mutation anzusehen.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit, ebenso wenig beweis-kräftig und prüfbar wie alle bisher für das Phänomen der petite- Negativität gelieferten, erscheint dennoch wert, hier diskutiert zu werden. Daß Mitochondrien und Bakterien gemeinsame Vorfahren be-sitzen, wird heute als sehr wahrscheinlich angesehen (Schnepf und Brown, 1971). Im Laufe der Entwicklung haben diese "Symbionten"

immer mehr ihrer Autonomie verloren, immer mehr ursprünglich mitochondrial codierte Funktionen wurden vom Kern übernommen. Als Beispiel wäre zu nennen, daß Bakterien (Rhodospirillum rubrum) ein dem Hefecytochrom sehr ähnliches c- Cytochrom synthetisieren. Postuliert man eine Analogie zwischen Mitochondrien und Bakterien, so könnte man folgerichtig schließen, daß das im Kern der Hefen codierte Cytochrom c ursprünglich von dessen bakteriellen Symbionten codiert worden war. Borst hat diese Entwicklung einmal in einem Referat über den Informationsgehalt der DNS während der Höherentwicklung der Organismen dargestellt - dieser kurze Abschnitt soll hier als Originalzitat gebracht werden (Borst, 1971):

This brings me to a third explanation that I have put forward on previous occasions and that has proved to be extremely repulsive to geneticists. This explanation says that eukaryotes in general are not happy with their mitochondrial DNA and that they are trying to get rid of it without simultaneously losing their mitochondria. According to this idea the mitochondrion started out as a nearly completely autonomous endosymbiotic bacterium. In the course of evolution more and more functions originally encoded in the symbiont DNA have been taken over by the nucleus. What we see in an animal mitochondrion are the last remnants of this bacterial genome. The use of this hypothesis is that it emphasizes that the evolutionary advantage of having an organelle DNA, which is usually taken for granted, may not exist at all. Hence, we may still find an organism (superman?) that manages to synthesize its mitochondria without mitochondrial DNA.

Der Schluß, der daraus für die petite- negativen Hefen gezogen werden kann, wäre, daß die mitochondriale DNS bei petite- negativen Hefen für die Zelle lebensnotwendige Informationen enthält, welche bei petite- positiven Hefen bereits an den Kern abgegeben sind. Das würde zumindest die letale Wirkung einer Mutation des rho⁰- Typs bei pe-

tite- negativen Hefen erklären, bei der die gesamte DNS der Mitochondrien verloren geht.

Eine Zusatzzerklärung müßte noch für den rho- suppressiv- Typ angebracht werden. Bei suppressiven petites besteht ein kerngesteuerter Regulationsmechanismus, welcher für die Aufrechterhaltung eines bestimmten Verhältnisses von Kern- zu mitochondrialer DNS sorgt. Postuliert man das Fehlen eines solchen Regulationsmechanismus bei petite- negativen Hefen (Williamson, persönliche Mitteilung), so ist jeder Typ der Deletionsmutation für petite- negative Hefen letal.

Offen bleibt immer noch die Möglichkeit mitochondrialer Punktmutationen, deren Nachweis bei Schizosaccharomyces auf große methodische Schwierigkeiten stößt.

Eine endgültige Lösung des Problems der petite- Negativität ist in Bälde nicht zu erwarten, doch gibt es vielversprechende Ansätze mit Hefegattungen, die petite- positive und petite- negative Arten enthalten, welche untereinander kreuzbar sind.

Literaturverzeichnis zu Schlußdiskussion

- Borst, P.: Size, structure and informational content of mitochondrial DNA. In: Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts. N. K. Boardman, A. W. Linnane, R. M. Smillie eds., North-Holland Publishing Company, Amsterdam- London, 260- 266, (1971)
- Bulder, C. J. E. A.: Induction of petite mutation and inhibition of synthesis of respiratory enzymes in various yeasts. Antonie van Leeuwenhoek 30, 1- 9, (1964a)
- Bulder, C. J. E. A.: Lethality of the petite mutation in petite negative yeasts. Antonie van Leeuwenhoek 30, 442- 454, (1964b)
- De Deken, R. H.: The dissociation of phenotypic and inheritable effects of euflavin in yeast. Exptl. Cell Res. 24, 145- 148, (1961)
- De Deken, R. H.: The crabtree effect and its relation to the petite mutation. J. Gen. Microbiol. 44, 149- 167, (1966)
- Foury, F.; Goffeau, A.: Glucose superrepressed and derepressed respiratory mutants in a "petite- negative" yeast: Schizosaccharomyces pombe 972h⁻. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 153- 160, (1972)
- Goffeau, A.; Colson, A. M.; Landry, Y.; Foury, F.: Modifications of mitochondrial ATPase in chromosomal respiratory- deficient mutants of a "petite- negative" yeast: Schizosaccharomyces pombe 972h⁻. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 1448- 1454, (1972)
- Herman, A. I.; Griffin, P. S.: Respiration- deficient mutants in Saccharomyces lactis. J. Bacteriol. 96, 457- 461, (1968)
- Heslot, H.; Goffeau, A.; Louis, C.: Respiratory metabolism of a "petite- negative" yeast Schizosaccharomyces pombe 972h⁻. J. Bacteriol. 104, 472- 481, (1970)
- Heslot, H.; Louis, C.; Goffeau, A.: Segregational respiratory- deficient mutants of a "petite negative" yeast Schizosaccharomyces pombe 972h⁻. J. Bacteriol. 104, 482- 491, (1970).

- Luha, A. A.; Sarcoe, L. E.; Whittaker, P. A.: Biogenesis of yeast mitochondria. Drug effects on the petite negative yeast *Kluyveromyces lactis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 396- 402, (1971)
- McClary, D. O.; Bowers, W. D. jr.: Mitochondrial changes accompanying acriflavine- induced petite mutation in *Saccharomyces fragilis*. *J. Ultrastruct. Res.* 25, 34- 45, (1968)
- Nagai, S.: Unstable and reversible forms of hereditary respiration deficiency in *Saccharomyces logos* and *S. rosei*. *Antonie van Leeuwenhoek* 35, Supplement: Yeast Symposium 1969, C 1 - C 2, (1969)
- Perlman, P. S.; Mahler, H. R.: A premutational state induced in yeast by ethidium bromide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 261- 267, (1971)
- Schnepf, E.; Brown, R. H., jr.: On relationships between endosymbiosis and the origin of plastids and mitochondria. In: *Origin and continuity of cell organelles*. J. Reinert und H. Ursprung eds., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 299- 322, (1971)
- Schwab, R.; Sebald, M.; Kaudewitz, F.: Influence of ethidium bromide on respiration in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molec. Gen. Genetics* 110, 361- 366, (1971)
- Slonimski, P. P.; Perrodin, G.; Croft, J.: Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: complete transformation of cells into respiratory deficient non- chromosomal "petites". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30, 232- 239, (1968)
- Trenina, G. A.; Bibikova, M. U.; Sarukhanova, L. E.: Production of mutants with oxidative defects in various yeast species. *Mikrobiologiya* 34, 300- 304, (1965)

Zusammenfassung der wichtigsten Arbeiten über chromosomale atmungs-
defekte Mutanten bei Hefen

Review- Artikel

Mortimer, R. K.; Hawthorne, D. C.: Yeast genetics.

In: Annual review of microbiology, C. E. Clifton, S. Raffel,
M. P. Starr ed., Vol. 20, 151- 168, (1966)

Linnane, A. W.; Haslam, J. M.; Lukins, H. B.; Nagley, P.:

The biogenesis of mitochondria in microorganisms.

In: Annual review of microbiology, C. E. Clifton, S. Raffel,
M. P. Starr ed., Vol. 26, 163- 198, (1972)

Beck, J. C.; Parker, J. H.; Balcavage, W. X.; Mattoon, J. R.:

Mendelian genes affecting development and function of yeast
mitochondria. In: Autonomy and biogenesis of mitochondria and
chloroplasts, a symposium sponsored by International Union of
Biochemistry, Australian Academy of Science and United States
National Academy of Sciences. N. K. Boardman, A. W. Linnane,

R. M. Smillie ed., North- Holland Publishing Company, Amsterdam-
London, 194- 204, (1971)

Originalarbeiten an Saccharomyces cerevisiae und S. carlsbergensis

1.) Mutanten des Zitronensäurezyklus

Bowers, W. D. jr.; McClary, D. O.; Ogur, M.: Electron microscopy
of a tricarboxylic acid mutant of Saccharomyces.

J. Bacteriol. 94, 482- 484, (1967)

Subik, J.; Kolarov, J.; Lachowicz, T. M.: A mutant of Saccharo-
myces cerevisiae lacking α - ketoglutarate dehydrogenase activity.

FEBS- Letters 27, 81- 84, (1972)

2.) Mutanten der Succinat- Dehydrogenase

Haboucha, J.; Masschelein, Ch. A.: Etude d'une déficience respi-
ratoire chez Saccharomyces carlsbergensis. Biochim. Biophys.

Acta 38, 1 - 11, (1960)

de Kok, J.: A succinate dehydrogenase- deficient yeast mutant.

8. FEBS- Meeting, Amsterdam 1972, Abstract 613

3.) Mutanten mit verschiedenen Cytochromdefizienzen

Chen, S. Y.; Ephrussi, B.; Hottinguer, H.: Nature génétique des mutants à déficience respiratoire de la souche B- II de la levure de boulangerie. Heredity 4, 337- 351, (1950)

(Untersuchungen an der Mutante p 1)

Ycas, M.; Starr, T. J.: The effect of glycine and protoporphyrin on cytochrome deficient yeast. J. Bacteriol. 65, 83- 88, (1953)

Raut, C.: A cytochrome deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Exp. Cell Res. 4, 295- 305, (1953)

Pittman, D.: Ultraviolet induction of respiration- deficient variants of *Saccharomyces* and their stability during vegetative growth. Cytologia (Tokyo) 24, 315- 325, (1959)

Pittman, D.; Webb, J. M.; Roschanmanesh, A.; Coker, L. E.: Evidence for the genetic control of photoreactivation. Genetics 45, 1023- 1037, (1960)

(Untersuchungen an den Mutanten p 5 und p 6)

Yotsuyanagi, Y.: Etudes sur le chondriome de la levure.

II. Chondriomes des mutants à déficience respiratoire.

J. Ultrastruct. Res. 7, 141- 158, (1962)

Sherman, F.: Respiration- deficient mutants of yeast.

I. Genetics. Genetics 48, 375- 385, (1963)

Sugimura, T.; Okabe, K.; Rudney, H.: Ubiquinone in respiration- deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta 82, 350- 354, (1964)

Sherman, F.; Slonimski, P. P. : Respiration- deficient mutants of yeast. II. Biochemistry. Biochim. Biophys. Acta 90, 1- 15, (1964)

Mackler, B.; Douglas, H. C.; Will, S.; Hawthorne, D. C.; Mahler, H. R.: Biochemical correlates of respiratory deficiency.

IV. Composition and properties of respiratory particles from mutant yeasts. Biochemistry 4, 2016- 2020 (1965)

(Untersuchungen an den Mutanten p 8, p 12 und p 13)

Jakob, H.: Complementation entre mutants a déficience respiratoire de *Saccharomyces cerevisiae*: établissement et regulation de la respiration dans les zygotes et dans leur proche descendance. *Genetics* 52, 75- 98, (1965)

(Untersuchungen an den Mutanten p 1, p 5, p 7)

Reilley, C.; Sherman, F.: Glucose repression of cytochrome a synthesis in cytochrome deficient mutants of yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 95, 640- 651, (1965)

Mounolou, J. C.; Jakob, H.; Slonimski, P. P.: Mitochondrial DNA from yeast "petite" mutants. Specific changes of buoyant density corresponding to different cytoplasmic mutations. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 24, 218- 224, (1966)

(Untersuchungen an der Mutante p 7)

Sugimura, T.; Okabe, K.; Nagao, M.; Gunge, N.: A respiration-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* which accumulates porphyrins and lacks cytochromes. *Biochim. Biophys. Acta* 115, 267- 275, (1966)

Sugimura, T.; Tanooka, H.: Photoreactivation of heme- protein lacking yeast, *Biochim. Biophys. Acta* 136, 154- 155, (1967)

Pretlow, T. P.; Sherman, F.: Porphyrins and zinc porphyrins in normal and mutant strains of yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 148, 629- 644, (1967)

(Untersuchungen an den Mutanten pop 1 und pop 2)

Gunge, N.; Sugimura, T.; Iwasaki, M.: Genetic analysis of a respiration- deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* lacking all cytochromes and accumulating coproporphyrin. *Genetics* 57, 213- 226, (1967)

Sugimura, T.; Nagao, M.; Iwasaki, M.; Miyake, S.; Gunge, N.: A respiration deficient mutant yeast which accumulates coproporphyrin and lacks cytochromes. Seventh Intern. Congr. Biochem., Tokyo, Abstract J- 50, 959

Miyake, S.; Sugimura, T.: Coproporphyrinogenase in a respiration-deficient mutant of yeast lacking all cytochromes and accumulating coproporphyrin. *J. Bacteriol.* 96, 1997- 2003, (1968)

- Morita, T.; Mifuchi, I.: Characterization of respiration- deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* lacking cytochromes a and c. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 191- 196, (1970)
- Miyake, S.; Sugimura, T.: Utilization of Protoporphyrin for the synthesis of cytochrome c in yeast deficient of heme biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 85- 90, (1970)
- Kuzela, S.; Pecikova, H.: Incorporation of ^3H - UTP into mitochondria isolated from cytoplasmic and nuclear respiratory deficient mitochondria. *Experientia* 26, 940- 941, (1970)
- Kotylak, Z.: A suppressor of a nuclear respiratory deficient mutant of yeast. *Acta Microbiologica Polonica, Series A: Microbiologia Generalis* 3, 109- 112, (1972)
- Werkheiser, D.; Pittman, D.: Induction of petite mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by ICR- 170 and their genetic characterization. *Genetics* 72, 177- 182, (1972)
- Ebner, E.; Mason, T.: Effect of nuclear mutations on mitochondrial protein synthesis. *Federation Proceedings* 31, Abstract 1402, (1972)
- Ebner, E.; Mennucci, L.; Schatz, G.: Mitochondrial assembly in respiration- deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Effect of nuclear mutations on mitochondrial protein synthesis. (1973), in the press)
- Ebner, E.; Mason, T. L.; Schatz, G.: Mitochondrial assembly in respiratory- deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. II. Effect of nuclear and extrachromosomal mutations on the formation of cytochrome c oxidase. (1973, in the press)
- Ebner, E.; Schatz, G.: Mitochondrial assembly in respiration- deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. III. A nuclear mutant lacking mitochondrial adenosine triphosphatase. (1973, in the press)

4.) Mutanten mit verändertem Cytochrom c

Slonimski, P. P.; Acher, R.; Péré, G.; Sels, A.; Somlo, M.:
Éléments du système respiratoire et leur régulation: cytochromes et iso- cytochromes. In: Mécanismes de régulation des activités cellulaires chez les microorganismes.

- Colloques internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique No 124, Marseille, 1963, 435- 461, (1965)
- Clavilier, L.; Péré, G.; Slonimski, P. P.; Somlo, M.: Contrôle génétique de la biosynthèse des isocytochromes c. Sixth International Congress of Biochemistry, New York, (1964). Abstract.
- Sherman, F.: Mutants of yeast deficient in cytochrome c. Genetics 49, 39- 48, (1964)
- Sherman, F.; Taber, H.; Campbell, W.: Genetic determination of iso- cytochromes c in yeast. J. Mol. Biol. 13, 21- 39, (1965)
- Sels, A. A.; Fukuhara, H.; Péré, G.; Slonimski, P. P.: Cinétique de la biosynthèse induite de l'iso-1-cytochrome c et de l'iso-2-cytochrome c au cours de l'adaptation à l'oxygène. Biochim. Biophys. Acta 95, 486- 502, (1965)
- Sherman, F.; Stewart, J. W.; Margoliash, E.; Parker, J.; Campbell, W.: The structural gene for yeast cytochrome c. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 55, 1498- 1504, (1966)
- Clavilier, L.; Fukuhara, H.; Péré, G.; Pradines, M.; Somlo, M.; Slonimski, P. P.: Régulation du système cytochromique chez la levure. Bull. Soc. Franc. Physiol. Vég. 12, 7- 15, (1966)
- Yaoi, Y.: Comparison of the primary structures of cytochromes c from wild and respiration- deficient mutant yeast. The Journal of Biochemistry 61, 54- 58, (1967)
- Sherman, F.; Stewart, J. W.; Parker, J. H.; Inhaber, E.; Shipman, N. A.; Putterman, G. J.; Gardisky, R. L.; Margoliash, E.: The mutational alteration of the primary structure of yeast iso-1-cytochrome c. J. Biol. Chem. 243, 5446- 5456, (1968)
- Clavilier, L.; Péré, G.; Slonimski, P. P.: Mise en évidence de plusieurs loci indépendants impliqués dans la synthèse de l'iso-2-cytochrome c chez la levure. Molec. Gen. Genetics 104, 195- 218, (1969)

- Stewart, J. W.; Sherman, F.; Shipman, N.; Thomas, F. L. X.; Cravens, M.: Longer and shorter iso-1-cytochromes c in chain initiator mutants of baker's yeast. Federation Proceedings 28/I, Abstract 1881, (1969)
- Parker, J. H.; Sherman, F.: Fine- structure mapping and mutational studies of gene controlling yeast cytochrome c. Genetics 62, 9- 22, (1969)
- Sherman, F.; Stewart, J. W.; Parker, J. H.; Putterman, G. J.; Agarwal, B. B. L.; Margoliash, E.: The relationship of gene structure and protein structure of iso-1-cytochrome c form yeast. In: Control of organelle development. Soc. Exp. Biol. Symp. 24. Cambridge Univ. Press, P. Miller ed., 85- 107, (1970)
- Aubert, G. (geb. Péré): Aspects de la regulation de la biosynthese du cytochrome c chez la levure. These de doctorat d'etat es-sciences naturelles, Paris, 1970
- Gilmore, R. A.; Stewart, J. W.; Sherman, F.: Amino acid replacements resulting from super- suppression of nonsense mutants of iso-1-cytochrome c form yeast. J. Mol. Biol. 61, 157- 173, (1971)
- Prakash, L.; Sherman, F.: Mutagen specificity: reversion of iso-1-cytochrome c mutants of yeast. Genetics 71, 48, (1972) Supplement.
- Sherman, F.; Liebman, S. W.; Stewart, J. W.; Jackson, M.: Tyrosine insertion by an amber suppressor in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 71, 58- 59, (1972) Supplement.
- 5.) Mutanten der oxidativen Phosphorylierung
- a) Die Mutante op 1
- Kovac, L.; Lachowicz, T. M.; Slonimski, P. P.: Biochemical genetics of oxidative phosphorylation. Science 158, 3308- 3311, (1967)
- Kovac, L.; Hrusovská, E.: Oxidative phosphorylation in yeasts. II. An oxidative phosphorylation- deficient mutant. Biochim. Biophys. Acta 153, 43- 54, (1968)

Kovacova, V.; Irmmlerova, J.; Kovac, L.: Oxidative phosphorylation in yeasts. IV. Combination of a nuclear mutation affecting oxidative phosphorylation with cytoplasmic mutation to respiratory deficiency. *Biochim. Biophys. Acta* 162, 157- 163, (1968)

Kovac, L.: Biochemical mutants as a tool in the study of mitochondrial function. *FEBS Symposium* 17, 199- 204, (1969)

Kovac, L.; Polakova, K.; Smigan, P.; Kuzela, S.: Lipids and structural protein of mitochondria from wild-type yeast and a mutant deficient in oxidative phosphorylation. *Antonie van Leeuwenhoek. Yeast Symposium 1969, The Proceedings of the third international symposium in yeasts, Delft- The Hague, G 11/12*, (1969)

Somlo, M.: Respiration- linked ATP- formation by an "oxidative phosphorylation mutant" of yeast. *Archives Biochem. Biophys.* 136, 122- 133, (1970)

Somlo, M.: Caracteristiques du "pool" des nucléotides adényliques d'une mutant "oxydations phosphorylantes" op 1 et de la souche sauvage correspondante. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 52, 532- 537, (1970)

Somlo, M.: Oxidative phosphorylation in intact cells of normal and op 1 mutant yeast undergoing respiratory adaptation. *Biochimie* 53, 819- 830, (1971)

Kolarov, J.; Subik, J.; Kovac, L.: Oxidative phosphorylation in yeast. IX. Modification of the mitochondrial adenine nucleotide translocation system in teh oxidative phosphorylation - deficient mutant op 1. *Biochim. Biophys. Acta* 267, 465- 478, (1972)

b) andere Mutanten der oxidativen Phosphorylierung

Gause, G. I. ; Kochetkova, G. V.; Vladimirova, G. B.: On biochemical mutants in yeast cells with impaired oxidation. *Doklady Acad. Sci. USSR* 117, 138, (1957)

Parker, J. H.; Mattoon, J. R.: Oxidative phosphorylation of yeast. *Genetics* 60, 210, (1968)

Beck, J. C.; Mattoon, J. R.; Parker, J. H.; Balcavage, W. X.: Properties of a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* with altered oxidative phosphorylation. *Federation Proceedings* 27/I, Abstract 3443, (1968)

- Beck, J. C.; Mattoon, J. R.; Hawthorne, D. C.; Sherman, F.: Genetic modification of energy conserving systems in yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 60, 187- 193, (1968)
- Parker, J. H.; Beck, J. C.; Mattoon, J. R.: Genetic control of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek* 35, Supplement: Yeast Symposium 1969, C5 - C6
- Parker, J. H.; Mattoon, J. R.: Mutants of yeast with altered oxidative energy metabolism. *J. Bacteriol.* 100, 647- 657, (1969)
- Subik, J.; Kuzela, S.; Kolarov, J.; Kovac, L.; Lachowicz, T. M.: Oxidative phosphorylation in yeast. VI. ATPase activity and protein synthesis from nuclear mutants deficient in cytochromes. *Biochem. Biophys. Acta* 205, 513- 519, (1970)
- Subik, J.; Kovac, L.; Kolarov, J.: Oxidative phosphorylation in yeast. X. Phosphorylation ability of mutants deficient in cytochromes a and b. *Biochem. Biophys. Acta* 283, 146- 154, (1972)

6.) Temperatursensible Mutanten

- Zakharov, I. A.; Stepanova, V. P.; Yaravoy, B. F.: A new class of yeast mutants with respiratory insufficiency: temperature-dependent mutants (TDM). *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 185, 690- 692, (1969)
- Puglisi, P. P.; Cremona, T.: Biochemical properties of a nuclear thermosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39, 461- 469, (1970)
- Uchide, A.; Suda, K.: A mutant of yeast with temperature sensitive respiration. *Jap. J. Genet.* 45, 261- 268, (1970)
- Chen, S.; Werkheiser, D.; Pittman, D.: An ICR- 170 induced temperature- sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective in respiration and cell division. *Genetics* 71, Supplement, S 10- S 11, (1971)

Miyake, S.; Iwamoto, Y.; Nagao, M.; Sugimura, T.; Ohsumi, M.:
Phenotype of a temperature- sensitive respiration- deficient
(cyt) mutant of yeast. J. Bacteriol. 109, 409- 415, (1972)

7.) Mutanten, bei denen die Aufrechterhaltung des rho⁺- Zu-
standes beeinflußt ist

Sherman, F.; Ephrussi, B.: The relationship between respiratory
deficiency and suppressiveness in yeast as determined with
segregational mutants. Genetics 47, 695- 700, (1962)
(Untersuchungen an den Mutanten p 5, p 6 und p 7)

Gunge, N.: Complementary genes controlling respiration of yeast
and their relation to the stability of the cytoplasmic
factor. Jap. J. Genet. 41, 215- 223, (1966)

Negrotti, T.; Wilkie, D.: Induction of respiratory deficiency
by repression of the respiratory system in a mutant of
Saccharomyces cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta 153,
341- 349, (1968)

Weislogel, P. O.; Butow, R. A.: Cold sensitive mutants of
Saccharomyces cerevisiae. Federation Proceedings 29/I,
Abstract 3961, (1970)

Weislogel, P. O.; Butow, R. A.: Low temperature and chloramphenicol
induction of respiratory deficiency in a cold sensi-
tive mutant of Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad.
Sci. U. S. 67, 52- 58, (1970)

Butow, R. A.; Weislogel, P. O.; Cederbaum, A.: Cold sensitive
mutants in yeast defective in mitochondrial function.
Federation Proceedings 30, Abstract 1010, (1971)

Cremona, T.; Pedrini, M. A.; Guerrini, A. M.: Petite induction
and mitochondrial functions in a nuclear temperature- sensi-
tive mutant in yeast. FEBS- Meeting Amsterdam 1972,
Abstract 609

Butow, R. A.: Conditionally defective products of mitochondrial
protein synthesis in yeast. FEBS- Meeting Amsterdam 1972,
Abstract 614

Butow, R. A.; Ferguson, M. J.; Cederbaum, A.: Low temperature induction of respiratory deficiency. *Biochemistry* 12, 158-164, (1973)

S.) Auxotrophe Mutanten mit sekundärer Atmungsdefizienz

Ogur, M.; Coker, L.; Ogur, S.: Glutamate auxotrophs in *Saccharomyces*. I. The biochemical lesion in the *glt 1* mutants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14, 193- 197, (1964)

Resnick, M. A.; Mortimer, R. K.: Unsaturated fatty acid mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 92, 597- 600, (1966)
(Diese Mutanten können Glycerin nicht verwerten)

Keith, A. D.; Resnick, M. R.; Haley, A. B.: Fatty acid desaturase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 98, 415-420, (1969)
(Diese Mutanten können Glycerin nicht verwerten)

Surdin, Y.; de Robichon- Szulmajster, H.; Lachowicz, T. M.; Slonimski, P. P.: Déficience en cytochrome oxydase chez les souches de *Saccharomyces cerevisiae* exigeant la thréonine pour leur croissance. 1. Relations génétiques. *European J. Biochem.* 7, 526- 530, (1969)

de Robichon- Szulmajster, H.; Surdin, Y.; Slonimski, P. P.: Déficience en cytochrome oxydase chez les souches de *Saccharomyces cerevisiae* exigeant la thréonine pour leur croissance. 2. Relations métaboliques. *European J. Biochem.* 7, 531- 536, (1969)

Originalarbeiten an den petite- negativen Hefen *Saccharomyces lactis* und *Schizosaccharomyces pombe*

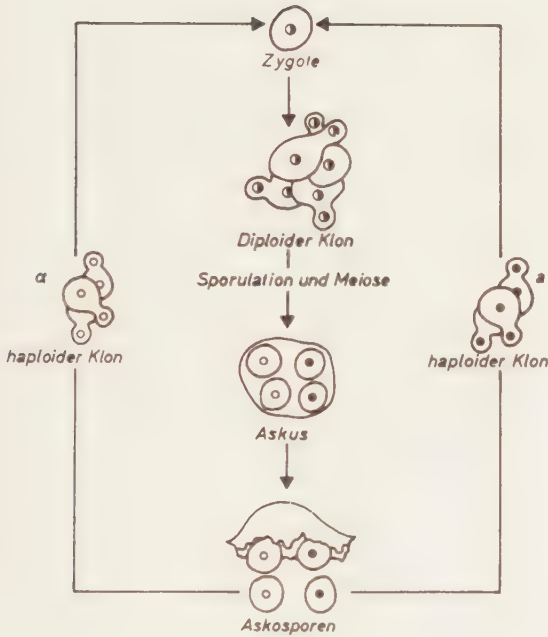
Herman, A. I.; Griffin, P. S.: Respiratory- deficient mutants in *Saccharomyces lactis*. *J. Bacteriol.* 96, 457- 461, (1968)

Heslot, H.; Louis, C.; Goffeau, A.: Segregational respiratory - deficient mutants of a "petite negative" yeast *Schizosaccharomyces pombe* 972h⁻. *J. Bacteriol.* 104, 482- 491, (1970)

- Wolf, K.; Sebald- Althaus, M.; Schweyen, R. J.; Kaudewitz, F.:
Respiration deficient mutants of *Schizosaccharomyces pombe* I.
Molec. Gen. Genetics 110, 101- 109, (1971)
- Bachofen, V.; Schweyen, R. J.; Wolf, K.; Kaudewitz, F.:
Quantitative selection of respiratory deficient mutants
in yeast by triphenyltetrazolium chloride.
Zeitschrift für Naturforschung 27b, 252- 256, (1972)
- Goffeau, A.; Colson, A. M.; Landry, Y.; Foury, F.: Modifications
of mitochondrial ATPase in chromosomal respiratory- deficient
mutants of a "petite- negative" yeast: *Schizosaccharomyces*
pombe 972h⁻. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 1448- 1454,
(1972)

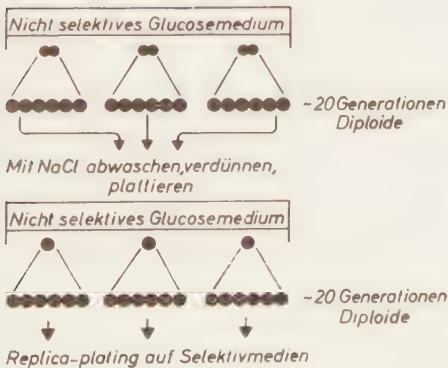
INDUKTION, SELEKTIVE ANREICHERUNG,
GENETISCHE UND BIOCHEMISCHE
CHARAKTERISIERUNG ATMUNGSDEFEKTER
MUTANTEN DER SPALTHEFE
SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE L.

FIGUREN UND TABELLEN



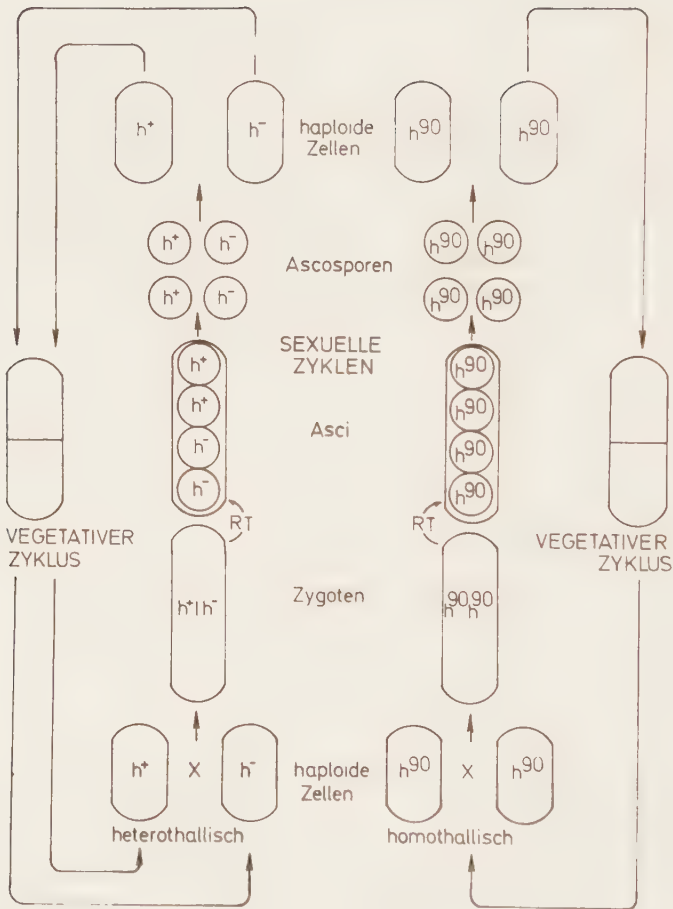
Figur 1

Lebenszyklus von *Saccharomyces cerevisiae*. Die diploide Phase ist bei *Saccharomyces cerevisiae* bevorzugt. Sporulation muß durch Überimpfen in bestimmte Medien eingeleitet werden. a und alpha sind chromosomale Paarungstypen.



Figur 2

Schematische Darstellung der quantitativen Analyse einer diploiden Population durch Replica-plating (quantitative replica-plating of random diploid cells). Während der ersten 20 Generationen laufen Kopulationen und mitotische Segregation ab, während der zweiten 20 Generationen nur mitotische Segregation.



Figur 3

Lebenszyklus von *Schizosaccharomyces pombe* L.

h⁺ und h⁻ = heterothallische Paarungstypen,

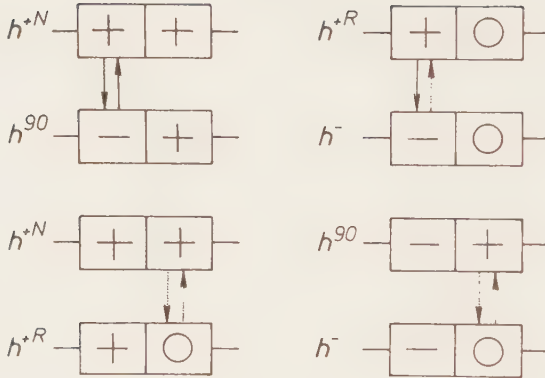
h⁹⁰ = homothallischer Paarungstyp,

RT = Reduktionsteilung

$2n \backslash n$	h^{+N}	h^{-}	h^{+R}	h^{90}
h^{+N}	0 0	Kop.	0	Kop.
h^{-}	Spor.	0 0	Kop.	Kop.
h^{+R}	(0)	Spor.	(0) 0	Kop.
h^{90}	Spor.	Spor.	Spor.	Kop. Spor.

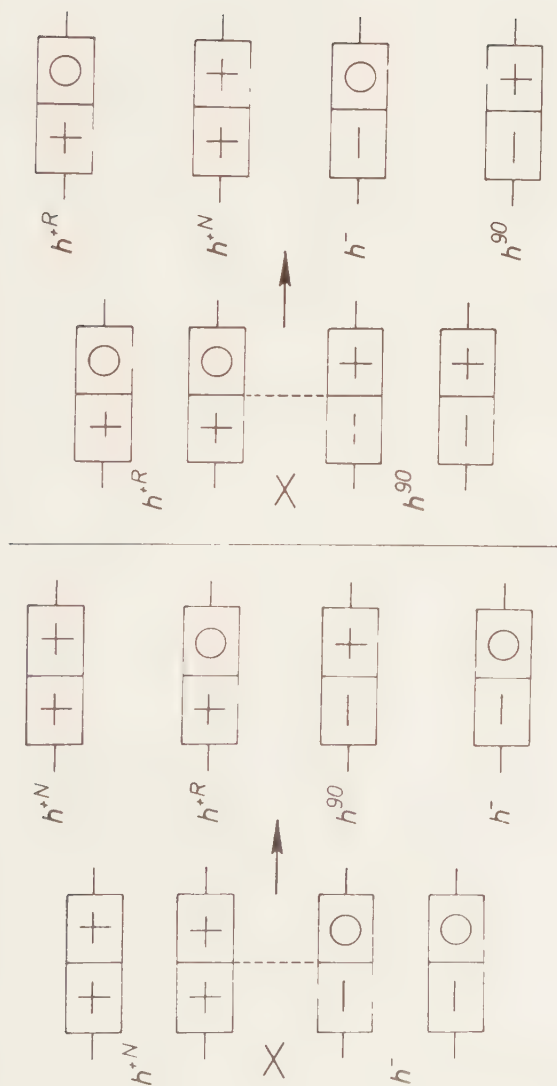
Figur 4

Schematische Darstellung der Unterschiede in der Paarungsreaktion paarweiser Kombinationen haploider Stämme der Konstitution h^{+N} , h^{-} , h^{+R} und h^{90} , sowie der Unterschiede in der Sporulation der diploiden Stämme entsprechender Paarungstypkonfiguration. In Klammern noch nicht synthetisierte diploide Konfigurationen. (h^{+N} - N steht für normal, h^{+R} - R steht für rekombinant, Kop. - nachgewiesene Kopulation, Spor. - nachgewiesene Sporulation) (nach Leupold, 1958, verändert)



Figur 5

Schematische Darstellung der Haupttypen von Mutationen in Stämmen der Konstitutionen h^{+N} , h^{-} , h^{+R} und h^{90} . Gestrichelt sind angenommene Mutationen, deren Existenz erst nachgewiesen werden muß. (nach Leupold, 1958, verändert)



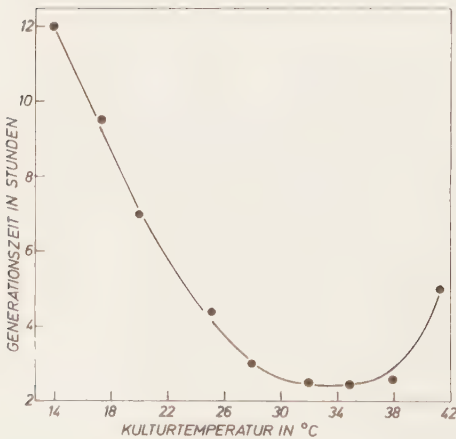
Figur 6

Schematische Darstellung der Entstehung der Paarungstypkonfigurationen h^{+R} und h^{90} aus der Kreuzung $h^{+N} \times h^{-}$ (links) und der Entstehung der Paarungstypkonfigurationen h^{+N} und h^{-} aus der Kreuzung $h^{+R} \times h^{90}$. (nach Leupold, 1958, verändert)



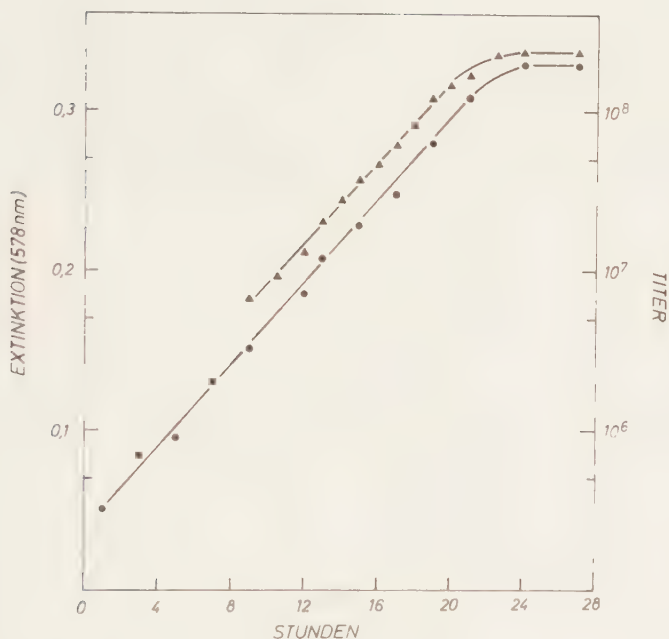
Figur 7

Haploide Zellen (M210h⁻ade6),
diploide Zellen
(M210/M216h⁻h⁻) und Asci
(aus der Kreuzung M216h⁻ade6
x M210h⁺ade6) zum Größen-
vergleich. Zeichnung der
Zellen von einer 4 Tage bei
25° C bebrüteten Malzagar-
platte. (Zeichenspiegel
Fa. ZeiB)



Figur 8

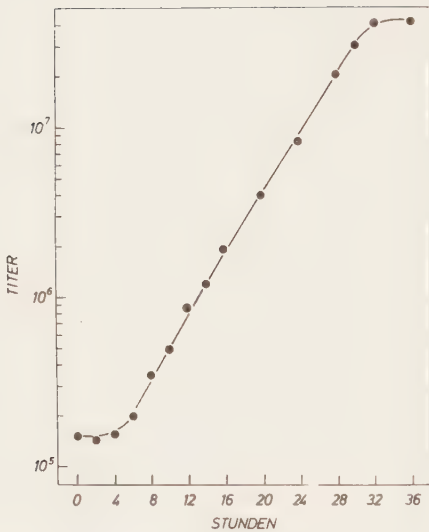
Darstellung der Abhängig-
keit der Generationszeit
eines haploiden Wildtyp-
stammes von *Schizosaccha-*
romyces pombe von der
Kulturtemperatur
(nach Mitchison, 1970)



Figur 9

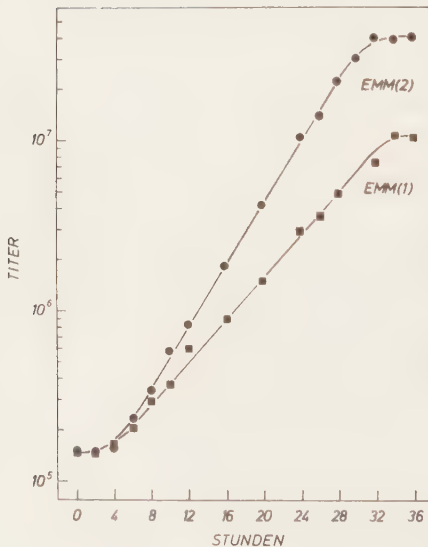
Wachstum von *Schizosaccharomyces pombe* 972h⁻ in Hefeextrakt- Medium mit 3 % Glucose in belüfteter Kultur bei 30⁰ C.

- ▲ — ▲ Extinktion, gemessen im Eppendorf-Photometer (0,5 ml Kultur, 1,5 ml H₂O)
- — ● ausgezählter Titer



Figur 10

Wachstum von *Schizosaccharomyces pombe* 972h⁻ im Minimalmedium nach Johnson mit L-Asparagin und KH₂PO₄ in belüfteter Kultur bei 30° C



Figur 11

Wachstum von *Schizosaccharomyces pombe* 972h⁻ in den Edinburgh-Minimalmedien EMM(1) und EMM(2) nach Mitchison in belüfteter Kultur bei 30° C. Die Wachstumsgeschwindigkeit in EMM(2) ist die selbe wie im Minimalmedium nach Leupold (nicht dargestellt)

Figur 12

Chromosomenkarte von *Saccharomyces cerevisiae*

Abkürzungen:

a und alpha

Paarungstyp

Auxotrophien:

ad	Adenin
ar	Arginin
hi	Histidin
is	Isoleucin oder Isoleucin+Valin
le	Leucin
ly	Lysin
met	Methionin
ph	Phenylalanin
py	Pyridoxin
pn	Pantothenat
ser	Serin
th	Thiamin
thr ₁ , thr ₄	Threonin
thr ₂ , thr ₃ , thr ₅ , thr ₆	Threonin+Methionin
tr	Tryptophan
ty ₁	Tyrosin
ty ₂ , ty ₄	Tyrosin+Phenylalanin
ty ₃	Tyrosin+Phenylalanin+Tryptophan
ur	Uracil

Resistenzen:

ac	Actidion
cana	Canavanin
CU	Kupfer

Figur 12

Chromosomenkarte von *Saccharomyces cerevisiae*

Abkürzungen:

Gene für Kohlehydrat- Verwertung:

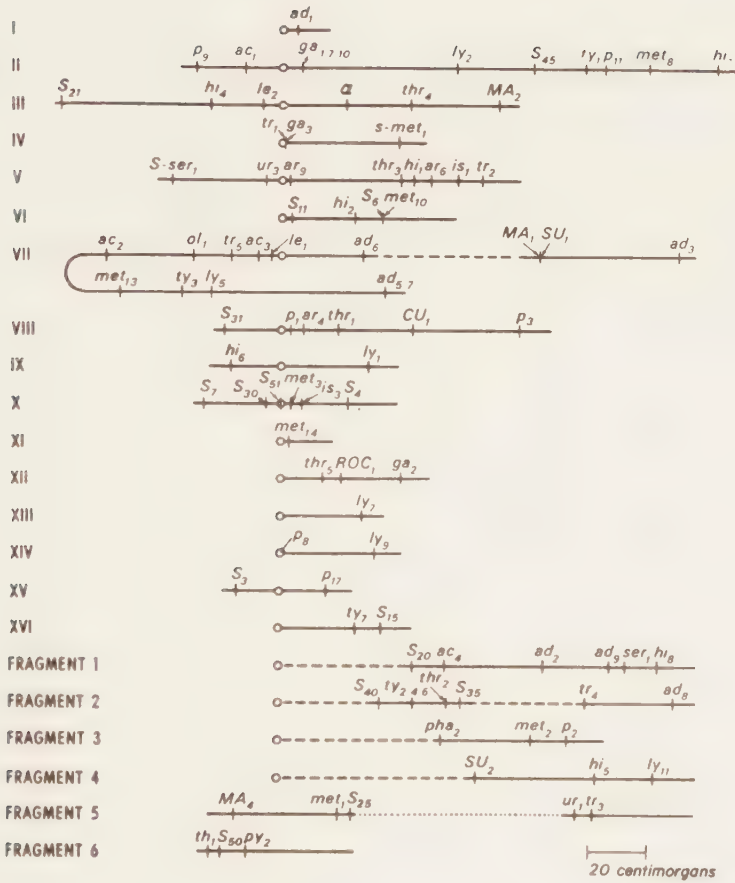
ga	keine Galactose- Vergärung
MA	Maltose- Vergärung
MEL	Melibiose- Vergärung
MG	alpha- Methylglucosid
SU	Sucrose- Vergärung

Gene für Atmungsdefizienz:

P ₁ , P ₂ , P ₃ , P ₄ , P ₆ , P ₈ , P ₉	Atmungsdefekte
--	----------------

Suppressoren:

S _a , S _d , S _h	Supersuppressoren
S-ser ₄ , s-met ₁	spezifische Suppressoren



Figur 12

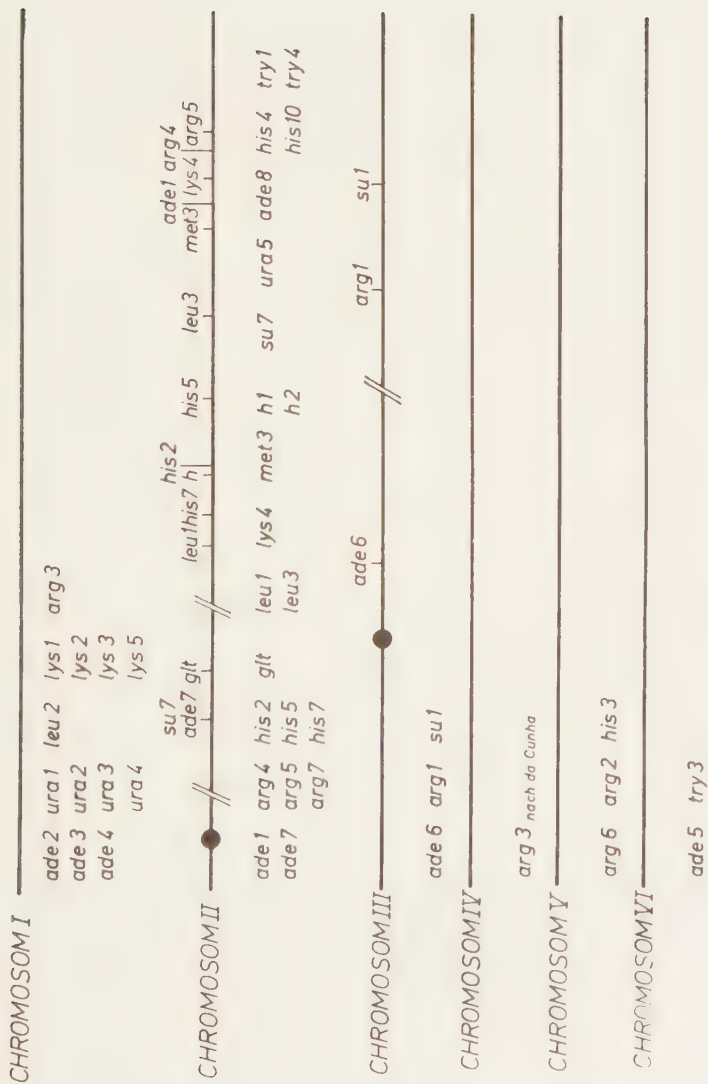
Chromosomenkarte von *Saccharomyces cerevisiae* (aus Hawthorne und Mortimer, 1968)

Figur 13

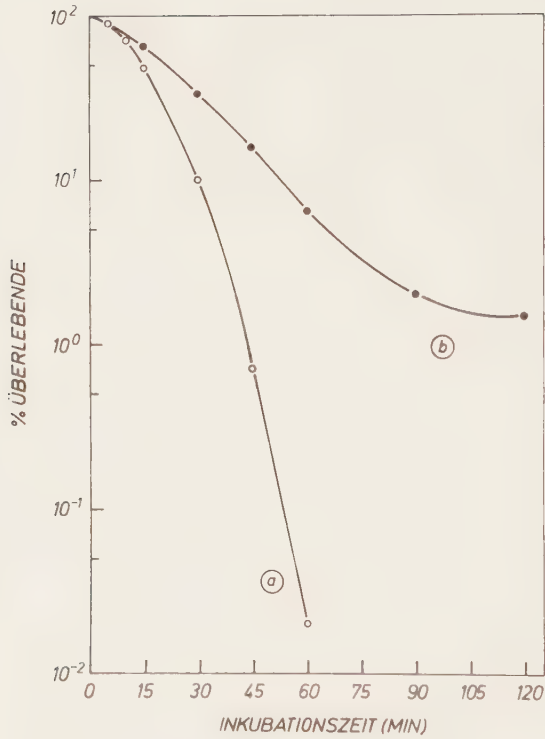
Chromosomenkarte von *Schizosaccharomyces pombe* L.
Die Karte enthält alle verfügbaren Daten bis Ende 1972.
Genaue Lagebeziehungen sind nur für das Chromosom II
bekannt. Die Rekombinationsfrequenz zwischen h 1 und h 2
beträgt 1,1/100 Ascosporen, die Rekombinationsfrequenz
zwischen h 2 und his 2 ebenfalls 1,1/100 Ascosporen.

Abkürzungen:

h 1 und h 2	Paarungstyp
Auxotrophien:	
ade 1, ade 2, ade 3, ade 4	Adenin
ade 5, ade 6, ade 7, ade 8	
arg 1, arg 2, arg 3, arg 4,	Arginin
arg 5, arg 6, arg 7	
glt	Glutamat
his 2, his 4, his 5, his 7,	Histidin
his 10	
leu 1, leu 2, leu 3,	Leucin
lys 1, lys 2, lys 3, lys 4,	Lysin
lys 5	
met 3	Methionin
try 1, try 3, try 4	Tryptophan
ura 1, ura 2, ura 3, ura 4,	Uracil
ura 5	
su 1	spezifischer Suppressor



Figur 13



Figur 14

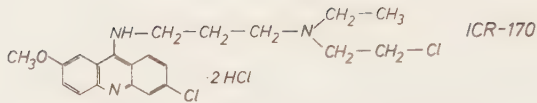
Darstellung der Inaktivierung von *Schizosaccharomyces pombe* 50h⁻ durch Nitro-soguanidin (NG) bei 30°C.

- a) 4 mg NG/ml Inkubationsgemisch
- b) 2 mg NG/ml Inkubationsgemisch

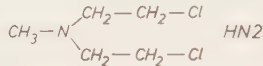
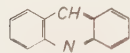


Figur 15

Darstellung der Inaktivierung von *Schizosaccharomyces pombe* 50h durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (UV)



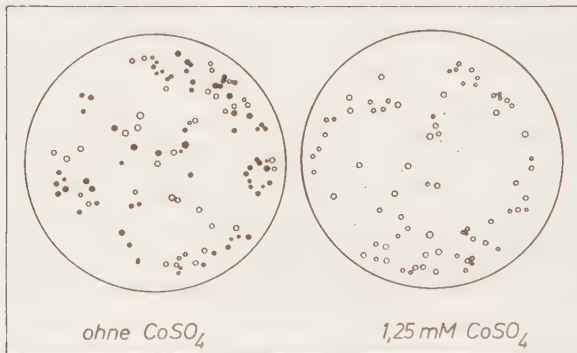
2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(ethyl-2-chloroethyl)-aminopropylamino]-
acridin dihydrochlorid



Methylbis(2-chloroethyl)amin hydrochlorid
(Stickstofflost)

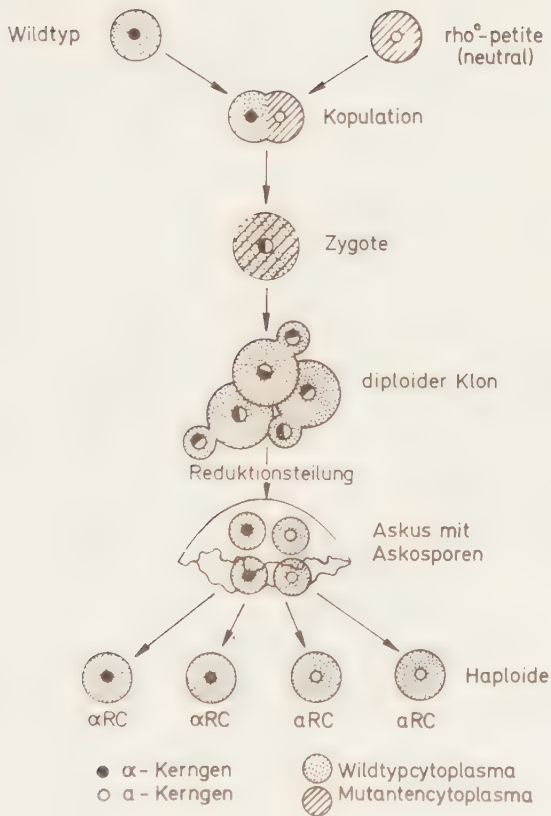
Figur 16

Strukturformeln des Mutagens ICR- 170 und seiner Bestandteile



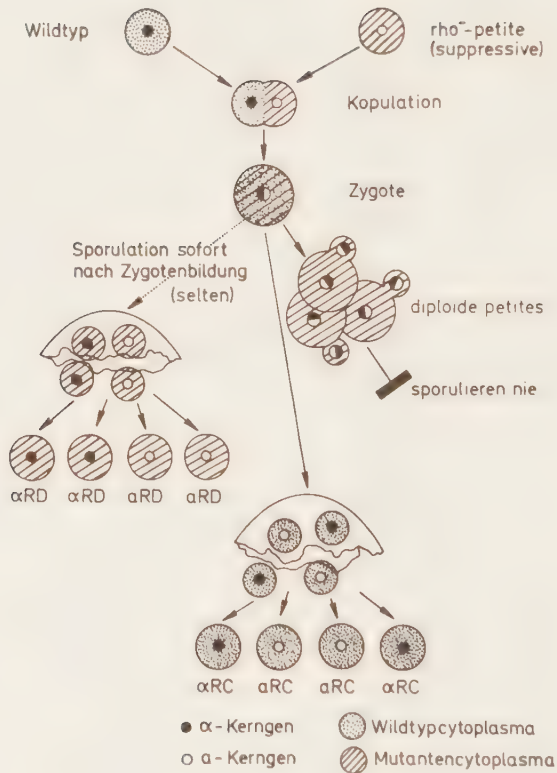
Figur 17

Wachstum eines Gemisches von 972h⁻ wt und der atemungsdefekten Mutante UV 2h⁻ ade7 von Schizosaccharomyces pombe auf Hefeextraktagar mit 2% Glucose und 1,25 mM CoSO₄. Auf der Kontrollplatte ohne CoSO₄ wachsen Wildtyp (schwarz) und Mutante (weiß) etwa gleich gut, auf der Platte mit 1,25 mM CoSO₄ wächst die Mutante unvermindert, der Wildtyp ist stark gehemmt. (Zeichnungen nach photographischen Aufnahmen)



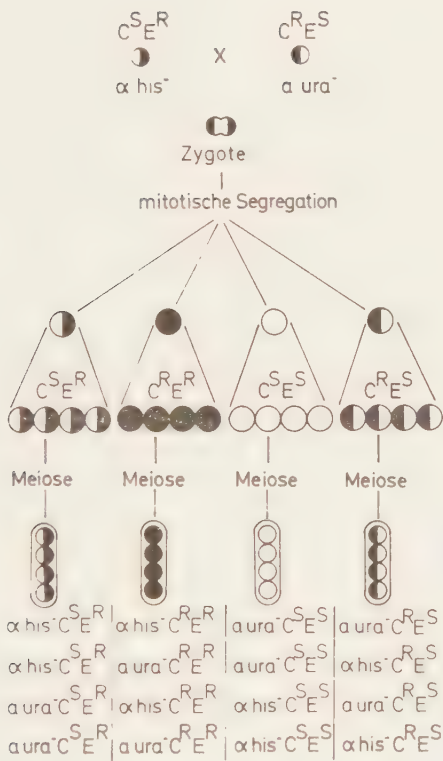
Figur 18

Kreuzung einer neutral petite von *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Wildtyp



Figur 19

Kreuzung einer suppressive petite von *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Wildtyp



Figur 20

Schematische Darstellung der beiden Hauptkriterien einer mitochondrial vererbten Mutation: mitotische Segregation und meiotische Nichtsegregation mitochondrialer Marker. Zum Vergleich ist die meiotische Segregation von Kernmarkern dargestellt.

C^R/C^S = Resistenz/Sensibilität gegen Chloramphenicol

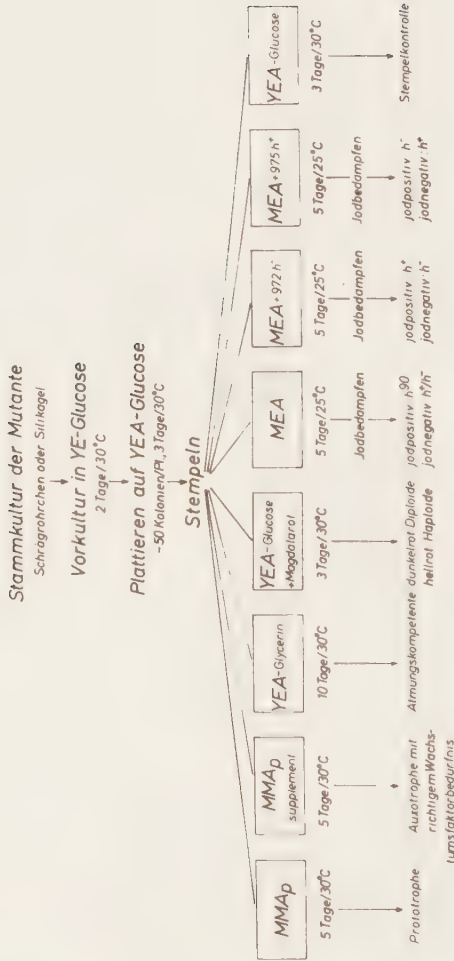
E^R/E^S = Resistenz/Sensibilität gegen Erythromycin



= resistent

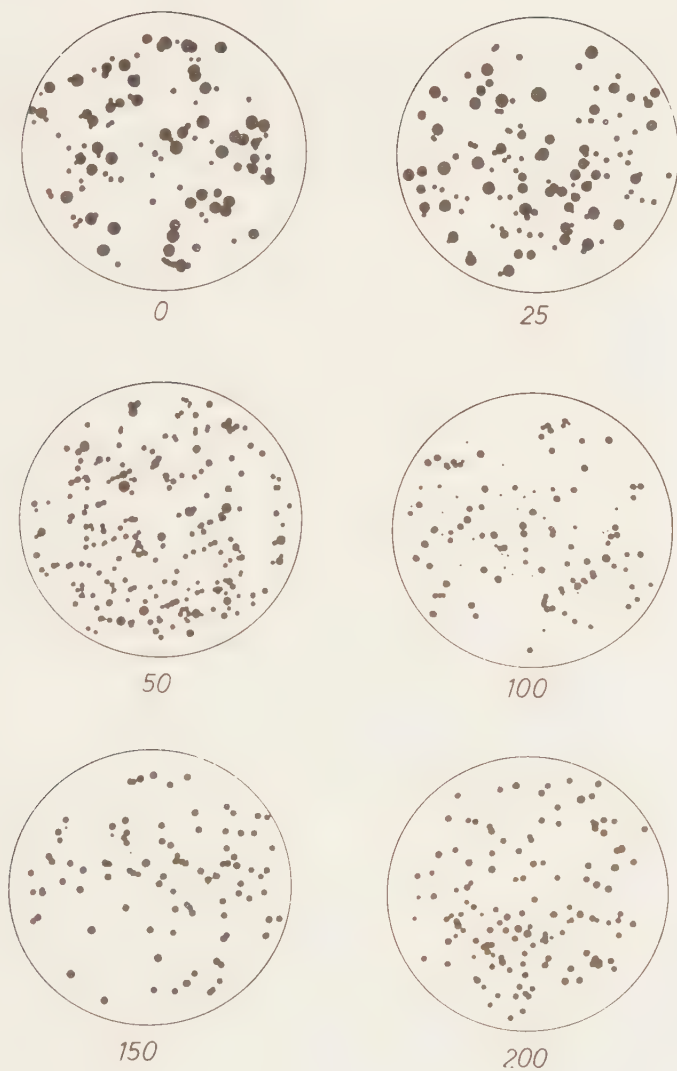


= sensibel



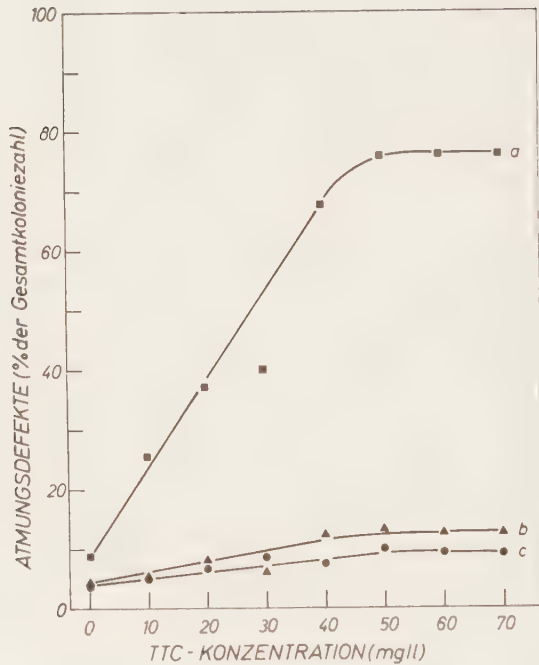
Figur 21

Schematische Darstellung der Reinigung einer atmungsdefekten Mutante von Schizosaccharomyces pombe.
 MMAp = Minimalagar, YEA = Hefeextrakt - Glycerin - Agar,
 YEA - Glucose = Hefeextrakt - Glucose - Agar, MEA = Malzagar.



Figur 22

Wachstum eines Gemischs des Wildtypstammes M 12 und einer rho^0 - petite von *Saccharomyces cerevisiae* auf Platten mit 2 % Glucose und verschiedenen (0 - 200 mg/l) TTC- Konzentrationen. Zeichnungen nach photographischen Aufnahmen.



Figur 23

Anreicherung atmungsdefekter Zellen von *Schizosaccharomyces pombe* in Flüssigmedien in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration.

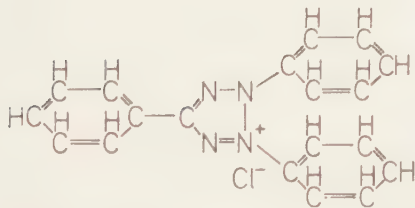
Eine Mischung von 95 % Wildtyp (50h⁻ ade7) und 5 % einer atmungsdefekten Mutante (h⁻ ADE7) wurde unter verschiedenen Bedingungen gezüchtet:

- a) 0,5 % Glucose, ohne Belüftung,
- b) 10 % Glucose, ohne Belüftung,
- c) 0,5 % Glucose, mit starker Belüftung.

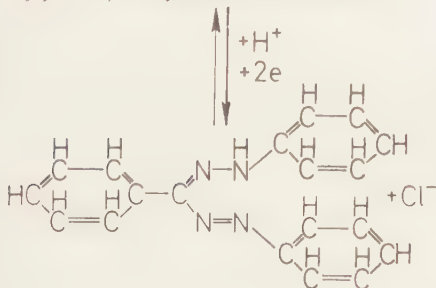
Oxidierter Zustand	E_0 (Volt)	Reduzierter Zustand
Oxidiertes Substrat	-0,42	Substrat
NAD^+	-0,32	$NADH+H^+$
$FAD+2H^+$	-0,05	$FADH_2$
Cytochrom $b(Fe^{+++})$	+0,04	Cytochrom $b(Fe^{++})$
Cytochrom $c(Fe^{+++})$	+0,26	Cytochrom $c(Fe^{++})$
Cytochrom $a(Fe^{+++})$	+0,29	Cytochrom $a(Fe^{++})$
Cytochrom $a_3(Fe^{+++})$	?	Cytochrom $a_3(Fe^{++})$
2,3,5-Triphenyl- tetrazoliumchlorid	+0,46	2,3,5-Triphenyl- formazan
$2H^+ + \frac{1}{2}O_2$	+0,82	H_2O

Figur 24

Redoxpotentiale der
Atmungskettenbe-
standteile und des
2,3,5-Triphenyl-
tetrazoliumchlorid



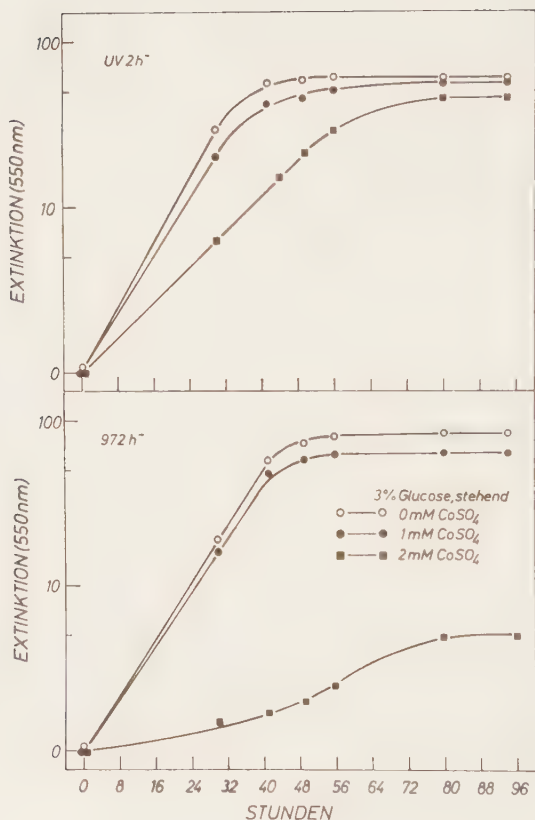
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid



2,3,5-Triphenylformazan

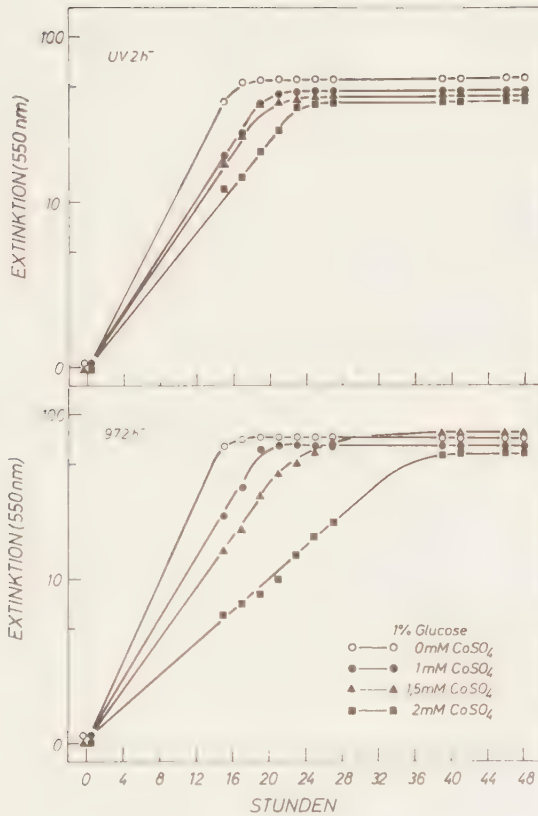
Figur 25

Reduktion des wasserlös-
lichen, farblosen 2,3,5-Tri-
phenyltetrazoliumchlorid
zum wasserunlöslichen, roten
2,3,5-Triphenylformazan



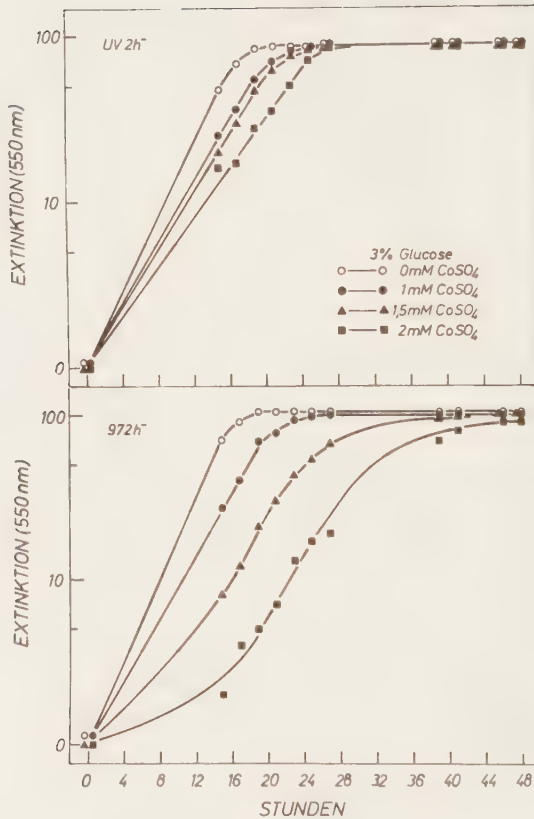
Figur 26

Wachstum der atmungsdefekten Mutante UV 2h⁻ und des Wild-typs 972h⁻ von *Schizosaccharomyces pombe* in stehender Flüssigkultur (30° C) in Hefeextraktmedium mit 3 % Glucose und verschiedenen Konzentrationen von CoSO₄. (Messung im Lumetron- Colorimeter)



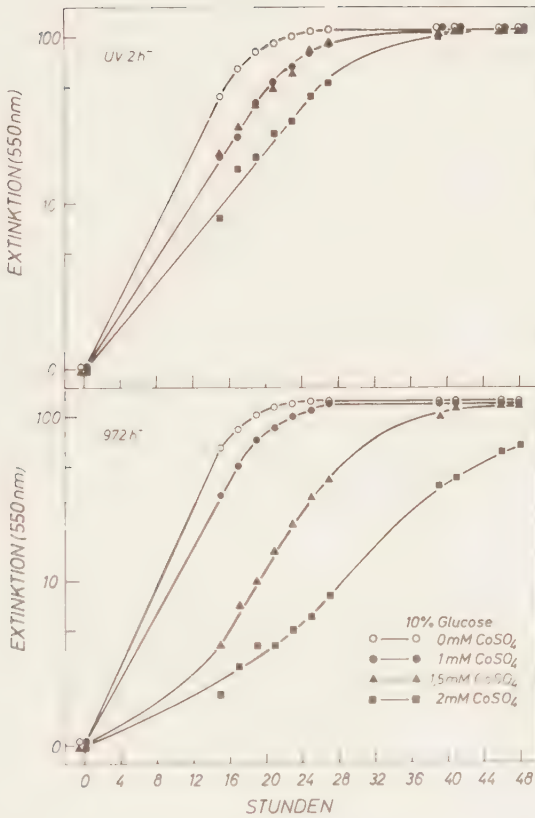
Figur 27

Wachstum der atmungsdefekten Mutante UV 2h⁻ und des Wildtyps 972h⁻ von *Schizosaccharomyces pombe* in Schüttelkultur (30°C, Reagenzglas mit 5 ml Medium) in Hefeextraktmedium mit 1 % Glucose und verschiedenen Konzentrationen von CoSO_4 . (Messung im Lumetron- Colorimeter)



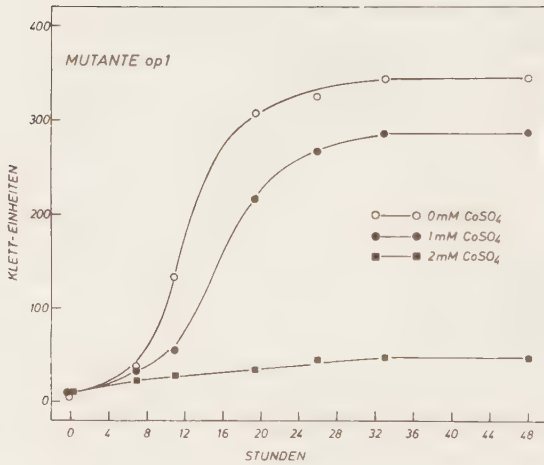
Figur 28

Wachstum der atmungsdefekten Mutante UV 2h⁻ und des Wild-typs 972 h⁻ von *Schizosaccharomyces pombe* in Schüttelkultur (30° C, Reagenzglas mit 5 ml Medium) in Hefeextraktmedium mit 3 % Glucose und verschiedenen Konzentrationen von CoSO₄. (Messung im Lumetron- Colorimeter)



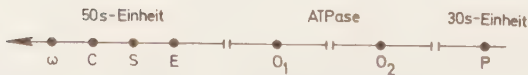
Figur 29

Wachstum der atmungsdefekten Mutante UV 2h⁻ und des Wild-typs 972h⁻ von *Schizosaccharomyces pombe* in Schüttelkultur (30° C, Reagenzglas mit 5 ml Medium) in Hefeextraktmedium mit 10 % Glucose und verschiedenen Konzentrationen von CoSO₄. (Messung im Lumetron- Colorimeter)



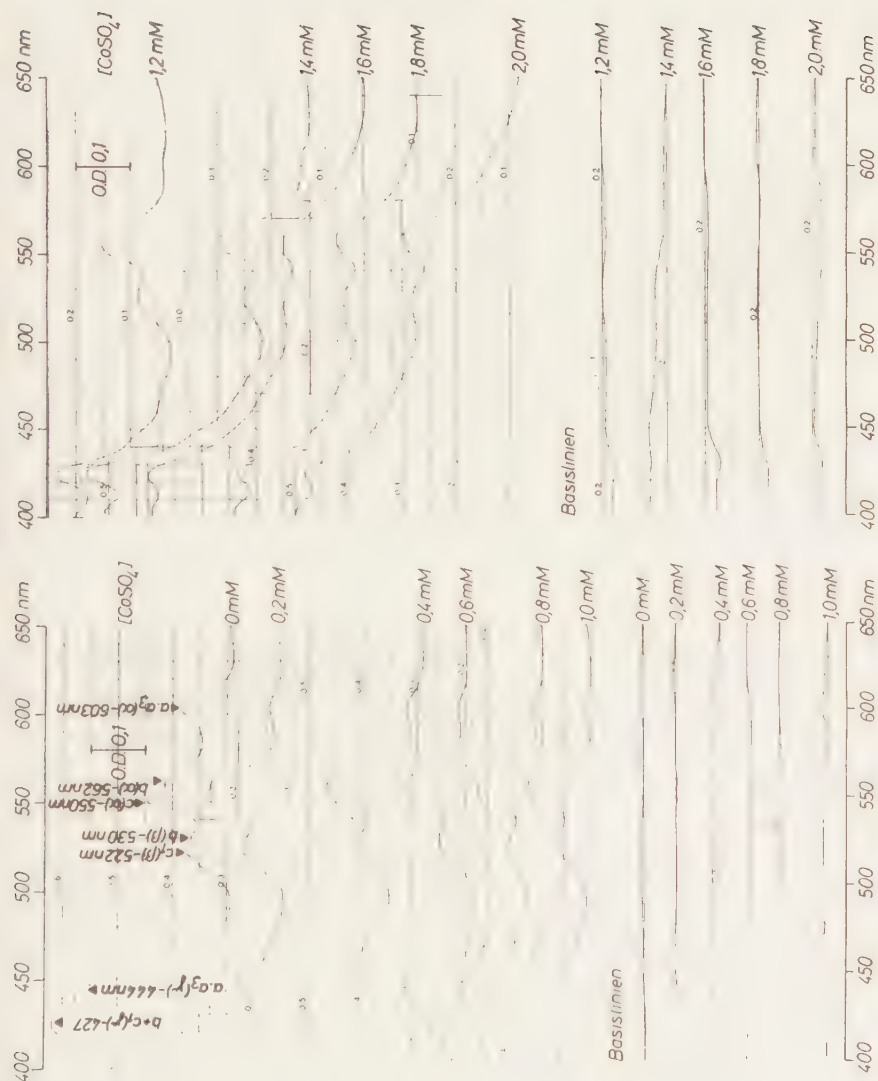
Figur 30

Wachstum der chromosomalen atmungsdefekten Mutante op 1 von *Saccharomyces cerevisiae* in Hefeextrakt- Pepton- Medium mit 2 % Glucose und verschiedenen Konzentrationen von CoSO₄. (10 ml Schüttelkultur in Klett- Erlenmeyer- Gefäßen, 30° C)



Figur 31

Karte des mitochondrialen Genoms von *Saccharomyces cerevisiae*.



Figur 32

Differenzspektren ganzer Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* M 12, gezogen in Hefeextrakt- Pepton- Medium mit 3 % Glucose und verschiedenen Cobaltkonzentrationen.

Figur 33

Differenzspektren ganzer Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* M 12, gezogen in Hefeextrakt- Pepton- Medium mit 3 % Galactose und verschiedenen Cobaltkonzentrationen.

400 450 500 550 600 650 nm
[CoSO₄]

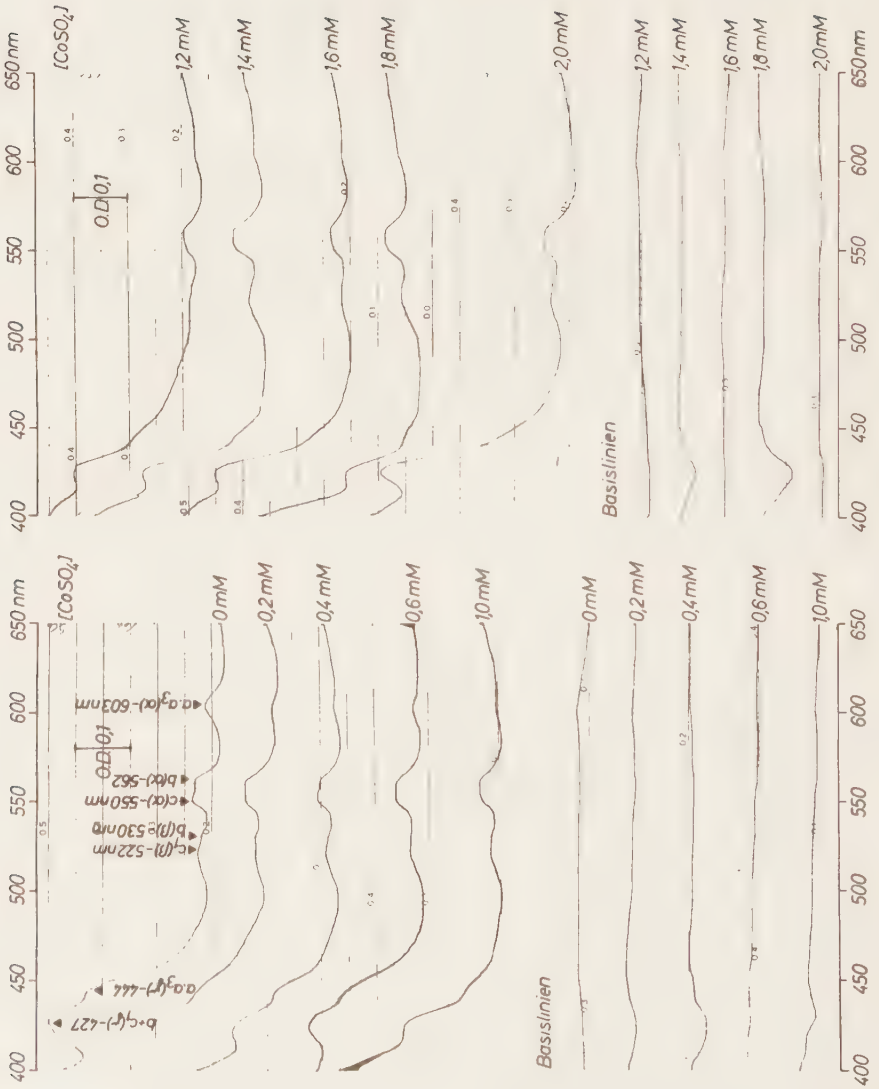
Figur 33



Basislinien

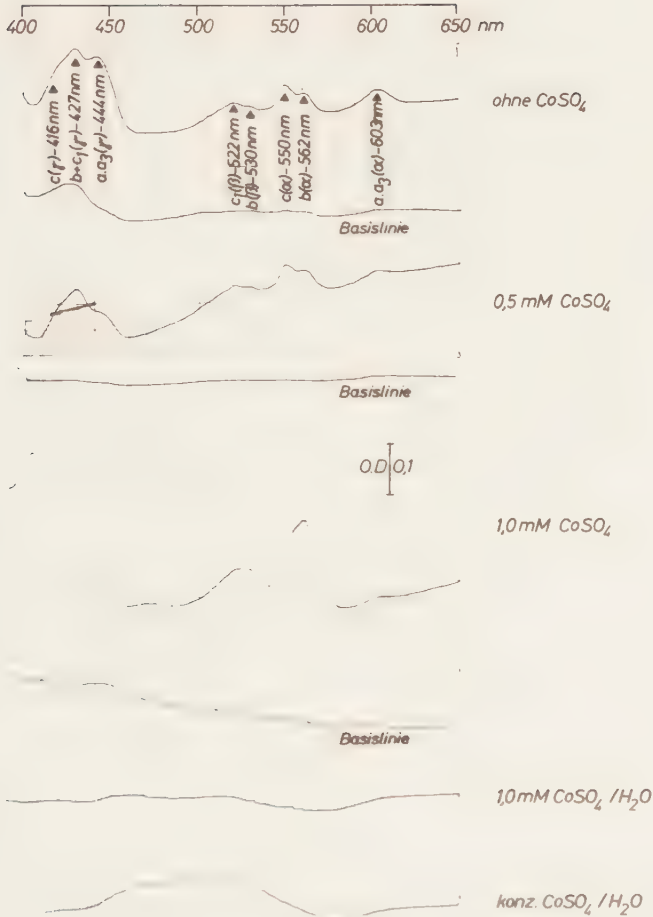


400 450 500 550 600 650 nm



Figur 34

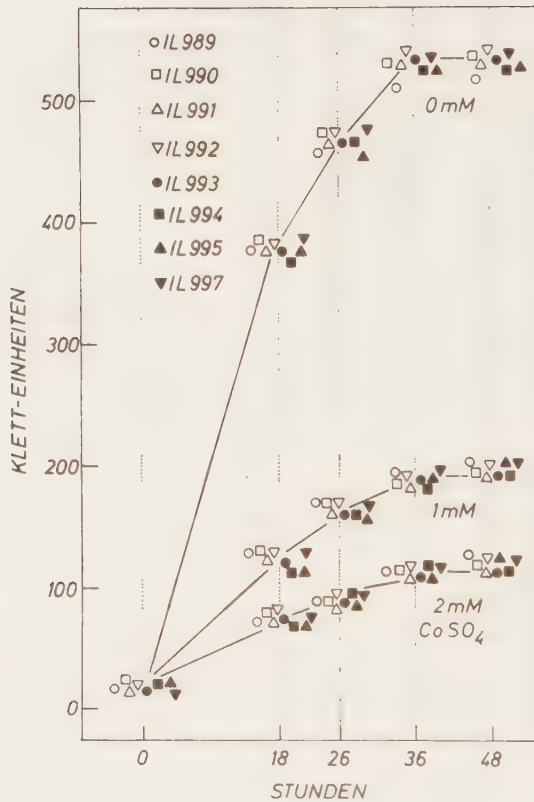
Differenzspektren ganzer Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* M 12, gezogen in Hefeextrakt- Pepton- Medium mit 3 % Glycerin und verschiedenen Cobaltkonzentrationen.



Figur 35

Oben: Differenzspektren differentiell gereinigter Mitochondrien aus Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* M 12, gezogen in Hefeextrakt- Pepton- Medium mit 3 % Glucose und verschiedenen Cobaltkonzentrationen. Unter jedem Spektrum ist die zugehörige Basislinie gezeigt.

Unten: Spektren von 1,0 mM CoSO_4 in Wasser und einer konzentrierten wäßrigen CoSO_4 -Lösung, gemessen gegen Wasser.



Figur 36

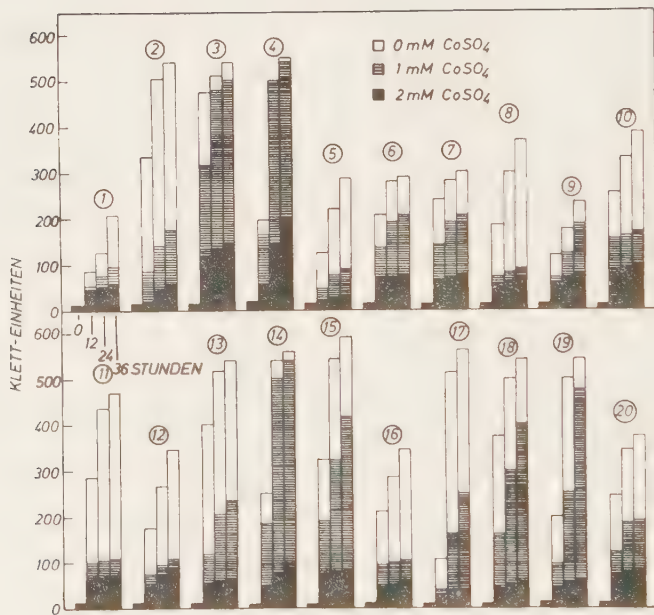
Wachstum isochromosomaler anisomitochondrialer Diploider von *Saccharomyces cerevisiae* in Hefeextrakt- Pepton- Medium mit 3 % Glycerin und verschiedenen Konzentrationen von CoSO_4 . (10 ml Schüttelkultur in Klett- Erlenmeyer- Gefäßen, 30°C_t)

Mitochondriale Genotypen			
IL 989	$\text{E}_{221}^{\text{R}} \text{O}_1^{\text{R}} \text{P}^{\text{S}}$	IL 993	$\text{E}_{221}^{\text{R}} \text{O}_1^{\text{R}} \text{P}_{454}^{\text{R}}$
IL 990	$\text{E}_{221}^{\text{R}} \text{O}^{\text{S}} \text{P}^{\text{S}}$	IL 994	$\text{E}_{221}^{\text{R}} \text{O}^{\text{S}} \text{P}_{454}^{\text{R}}$
IL 991	$\text{E}^{\text{S}} \text{O}^{\text{S}} \text{P}_{454}^{\text{R}}$	IL 995	$\text{E}^{\text{S}} \text{O}_1^{\text{R}} \text{P}^{\text{S}}$
IL 992	$\text{E}^{\text{S}} \text{O}^{\text{S}} \text{P}^{\text{S}}$	IL 997	$\text{E}^{\text{S}} \text{O}_1^{\text{R}} \text{P}_{454}^{\text{R}}$

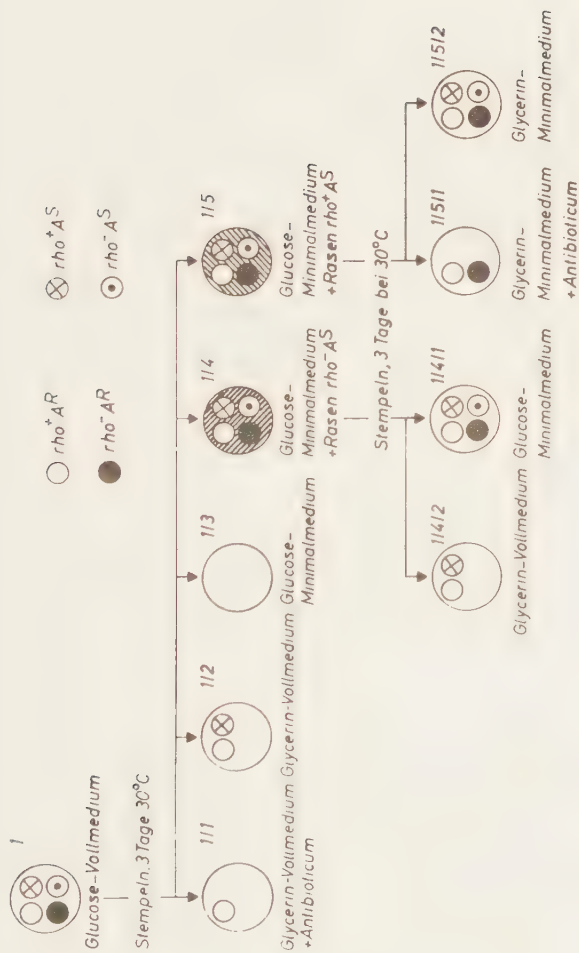
Figur 37

Wachstum verschiedener haploider Wildtypstämme und antibiotica-resistenter mitochondrialer Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae* in Hefeextrakt- Pepton- Medium mit 2 % Glycerin und verschiedenen Cobaltkonzentrationen. Die vier Säulen stellen jeweils vier Meßpunkte (0, 12, 24 und 36 Stunden) dar.

1	M 12	omega ⁻	C ^S E ^S O ^S P ^S
2	55R5-3C	omega ⁺	C ^S E ^S O ^S P ^S
3	IL 166-4B	omega ⁺	C ^S E ^S O ^S P ^S
4	IL 125-2D	omega ⁻	C ^S E ^S O ^S P ^S
5	IL 187-4C	omega ⁺	C ₃₂₁ ^R E ^S O ^S P ^S
6	IL 164-6B	omega ⁺	C ₃₂₁ ^R E ^S O ^S P ^S
7	IL 102-5D	omega ⁻	C ^S E ₂₂₁ ^R O ^S P ^S
8	D22/A15	omega ⁺	C ^S E ^S O ₁₄₄ ^R P ^S
9	M 12/454	omega ⁻	C ^S E ^S O ^S P ₄₅₄ ^R
10	IL 458-1A	omega ⁺	C ₃₂₁ ^R E ₂₂₁ ^R O ^S P ^S
11	IL 8-4C	omega ⁺	C ₃₂₁ ^R E ₅₁₄ ^R O ^S P ^S
12	IL 126-3C	omega ⁻	C ₃₂₁ ^R E ₂₂₁ ^R O ^S P ^S
13	IL 781-4D	omega ⁺	C ₃₂₁ ^R E ^S O ₁ ^R P ^S
14	IL 216-1D	omega ⁺	C ^S E ₂₂₁ ^R O ₁ ^R P ^S
15	IL 962-2C	omega ⁺	C ₃₂₁ ^R E ^S O ^S P ₄₅₄ ^R
16	IL 780-7A	omega ⁻	C ^S E ₂₂₁ ^R O ₁ ^R P ^S
17	IL 779-2B	omega ⁺	C ^S E ₂₂₁ ^R O ₁ ^R P ^S
18	IL 978-7D	omega ⁺	C ^S E ₂₂₁ ^R O ₁ ^R P ₄₅₄ ^R
19	IL 828-4B	omega ⁺	C ₃₂₁ ^R E ₂₂₁ ^R O ₁ ^R P ^S
20	PS 228-1A	omega ⁻	C ₃₂₁ ^R E ₂₂₁ ^R O ₁₄₄ ^R P ^S

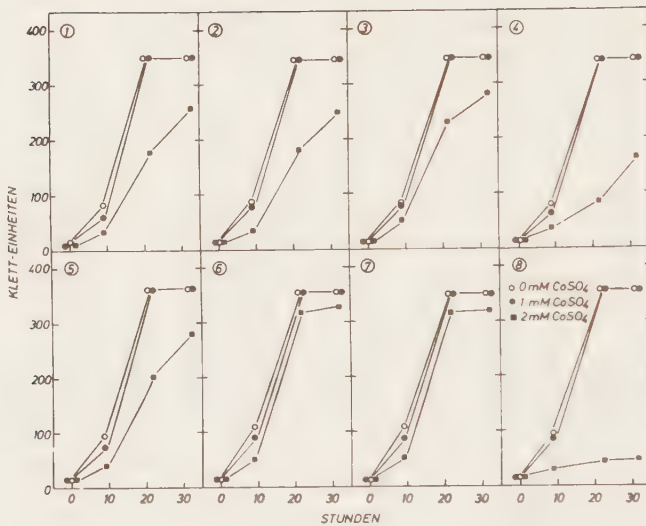


Figur 37



Figur 38

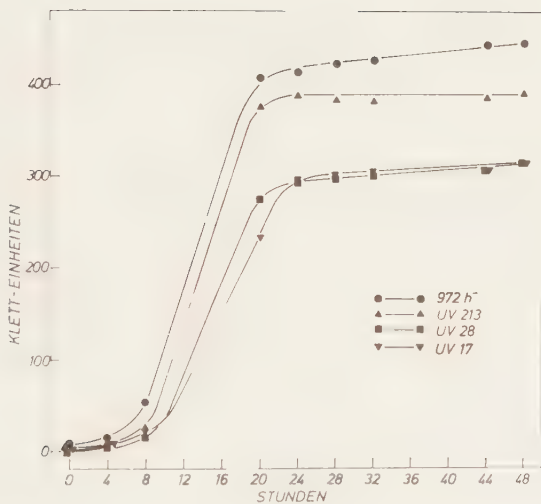
Schematische Darstellung des Replica-cross-Verfahrens zur Bestimmung der mitochondrial codierten genetischen Information zur Antibiotica-Resistenz in petites. Durch dieses Verfahren wird ebenfalls die Stabilität eines Resistenz-Markers in einem petite-Klon getestet. A^R = antibiotica-resistenter Klon, A^S = antibiotica-sensibler Klon



Figur 39

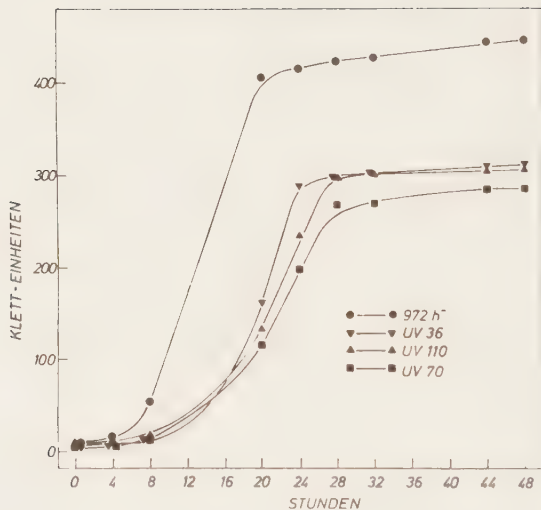
Wachstum vegetativer petites mit verschiedenen Deletionen der mitochondrialen DNS in Hefeextrakt- Pepton- Medium mit 2 % Glucose und verschiedenen Konzentrationen von CoSO₄ (10 ml Schüttelkultur in Klett- Erlenmeyer- Gefäßen, 30° C)

Nummer	Stamm	Mitochondriale Genotypen
1	IL 8-8C/E4/1	C ⁰ E ⁰ R ⁰ O ⁰
2	IL 8-8C/614/2	C ⁰ E ⁰ R ⁰ O ^S
3	IL 8-8C/D6/1	C ^R E ⁰ O ⁰
4	IL 8-8C/R5/3	C ^R E ⁰ R ⁰ O ⁰
5	IL 126-2A/52	C ⁰ E ⁰ O ⁰
6	IL 16-10B/B5/1	C ^R E ^S O ⁰
7	IL 16-10B/B1	C ^R E ^S O ⁰
8	IL 828-4B/271/41/1	C ⁰ E ⁰ O ^R



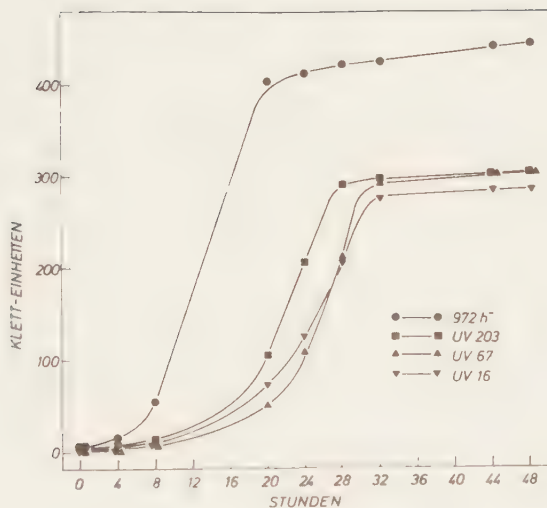
Figur 40

Wachstum von *Schizosaccharomyces pombe* 972h⁻ wt und drei atmungsdefekter Mutanten in Hefeextraktmedium mit 3 % Glucose (10 ml Schüttelkultur in Klett- Erlenmeyer- Gefäßen, 30° C)



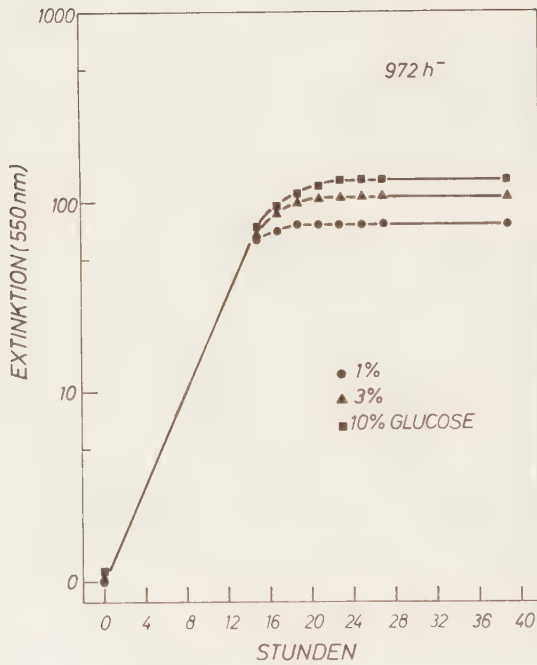
Figur 41

Wachstum von *Schizosaccharomyces pombe* 972h⁻ wt und drei atmungsdefekter Mutanten in Hefeextraktmedium mit 3 % Glucose (10 ml Schüttelkultur in Klett- Erlenmeyer- Gefäßen, 30° C)



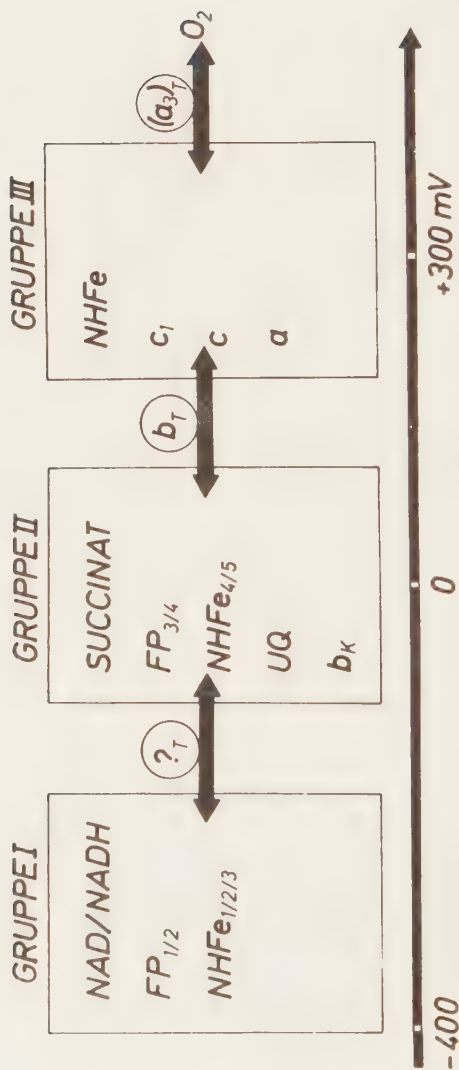
Figur 42

Wachstum von *Schizosaccharomyces pombe* 972h⁻ wt und drei atmungsdefekten Mutanten in Hefeextraktmedium mit 3 % Glucose (10 ml Schüttelkultur in Klett- Erlenmeyer- Gefäßen, 30° C)



Figur 43

Wachstum von *Schizosaccharomyces pombe* 972h⁻ wt in Hefeextraktmedium mit verschiedenen Glucosekonzentrationen (5 ml Schüttelkultur im Reagenzglas, 30°C, Lumetron-Colorimeter)



Figur 45

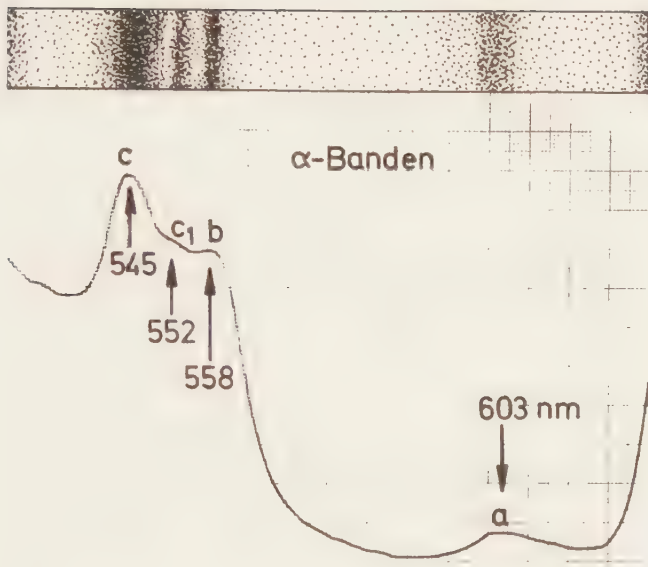
Elektronentransportkette mit fixierten (Gruppe I, II, III) und variablen ($?_T$, b_T , $(\text{a}_3)_T$) Redoxpotential- Komponenten.

$\text{FP}_{1/2/3/4}$ = Dehydrogenasen; $\text{NHFe}_{1/2/3/4/5}$ = Nichthämeisen- Proteine;

$?_T$ = unbekannte Carriersubstanz (T = transducing); UQ = Ubichinon; b_K = Cytochrom b_K (K steht für Keilin, der zum ersten Mal ein b- Cytochrom beschrieben hat);

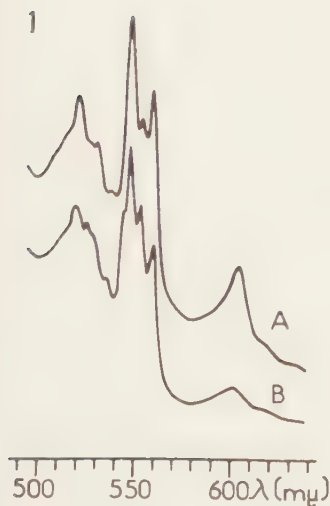
b_T = Cytochrom b_T (T = transducing); c_1 , c und a = Cytochrome c_1 , c und a ,

$(\text{a}_3)_T$ = Cytochrom a_3 (T = transducing)



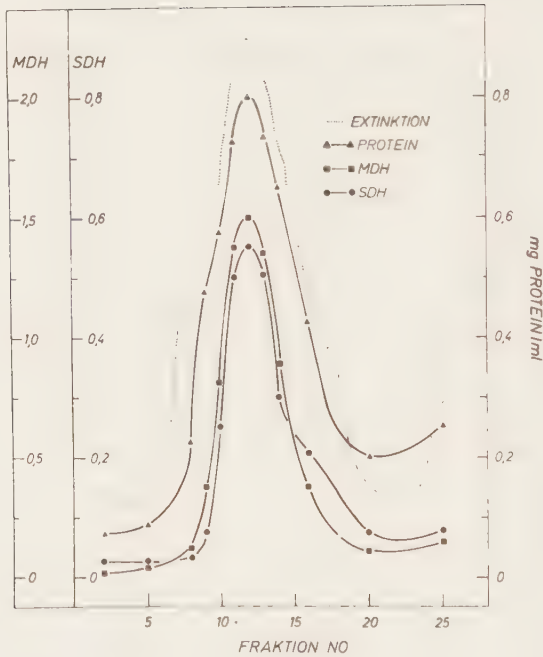
Figur 46

Zeichnung nach einer photographischen Aufnahme eines Tieftemperaturspektrums von ganzen Zellen des Wildtyps 972h⁻ von *Schizosaccharomyces pombe* nach der Methode von Sherman (oben) und Densitogramm des Hochglanzabzugs der Photographie.



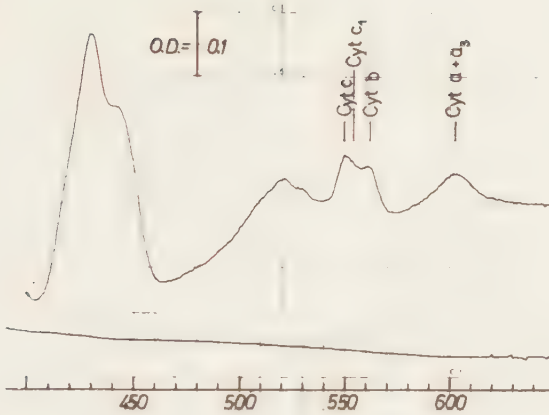
Figur 47 (links)

Absolutes Tieftemperaturspektrum ganzer Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* (A) und *Schizosaccharomyces pombe* (B) (Cary 15) (aus Claisse, 1969)



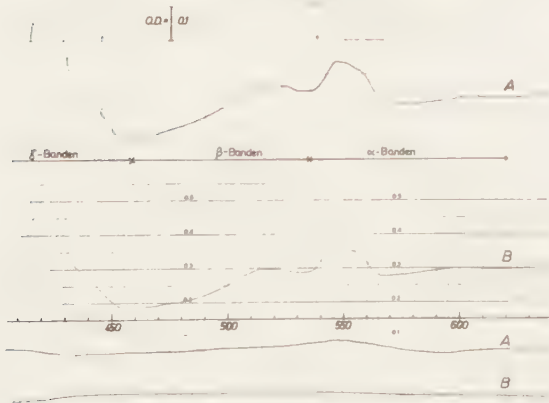
Figur 48

Verteilung der Succinat- Cytochrom c- Reduktase (SDH)(E 550 nm/min x mg Protein), Malatdehydrogenase (MDH)(E 340 nm/min x mg Protein) und Extinktion bei 420 nm nach Gradientenzentrifugation differentiell gereinigter Mitochondrien.



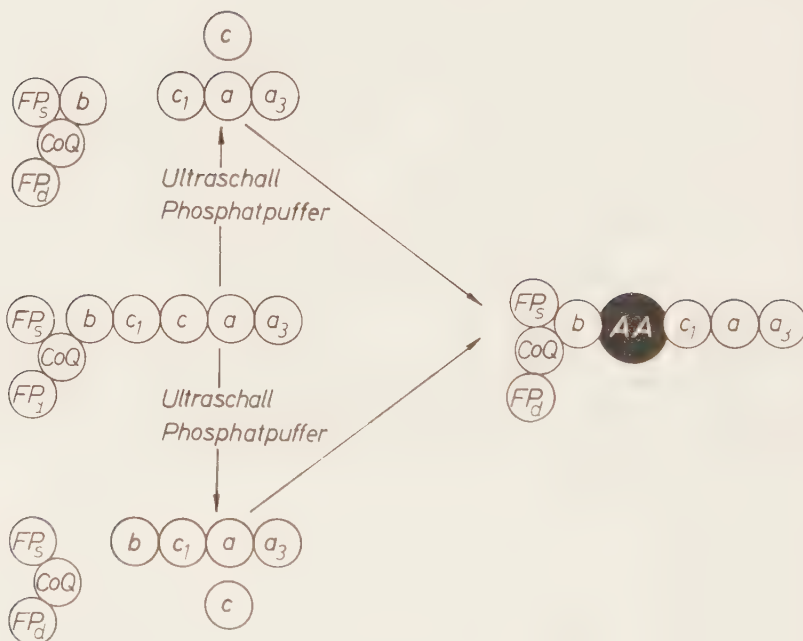
Figur 49

Differenzspektrum differentiell zentrifugierter Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* M 12. Das Spektrum wurde mit einer durch wenig kristallines Dithionit reduzierten gegen eine durch Wasserstoffperoxid oxidierten Suspension aufgenommen. Darunter befindet sich die Basislinie, die von der unbehandelten Suspension stammt.



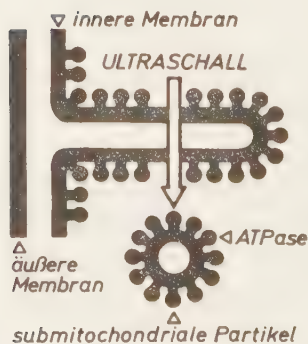
Figur 50

Differenzspektrum von *Schizosaccharomyces pombe* 972h⁻ (dithionit- reduziert gegen wasserstoffperoxid- oxidiert)
 A) differentiell zentrifugierte Mitochondrien
 B) über Sucrosegradienten gereinigte Mitochondrien



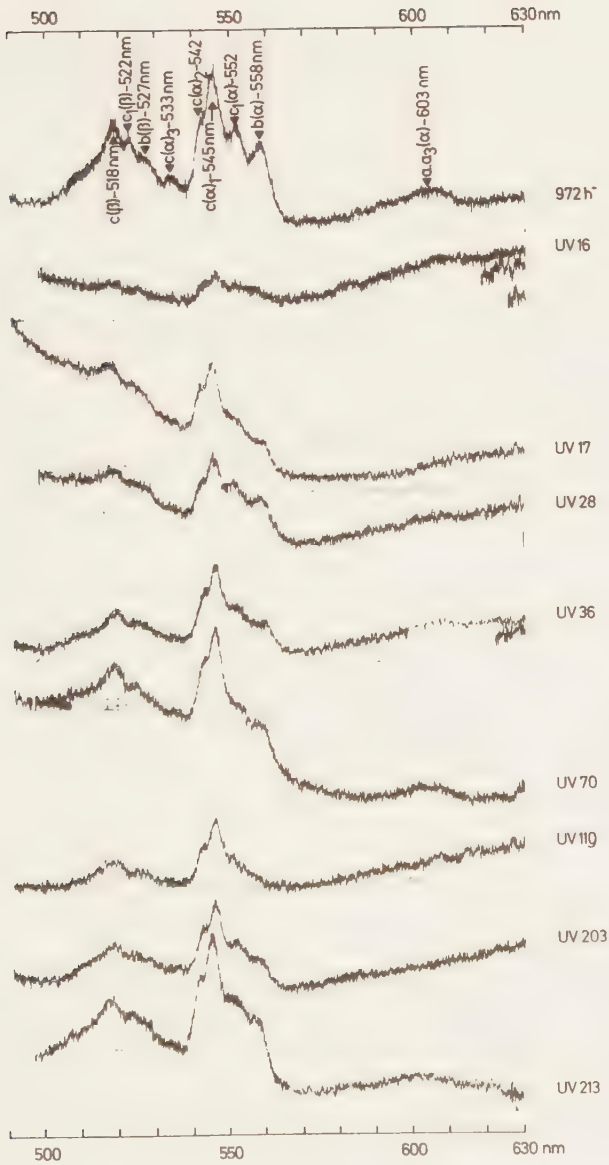
Figur 51

Schematische Darstellung der Wirkung einer Ultraschallung von Mitochondrien, der Herstellung submitochondrialer Partikel und Einlagerung von Antimycin A (AA) zwischen die Komponenten der inneren Membran.



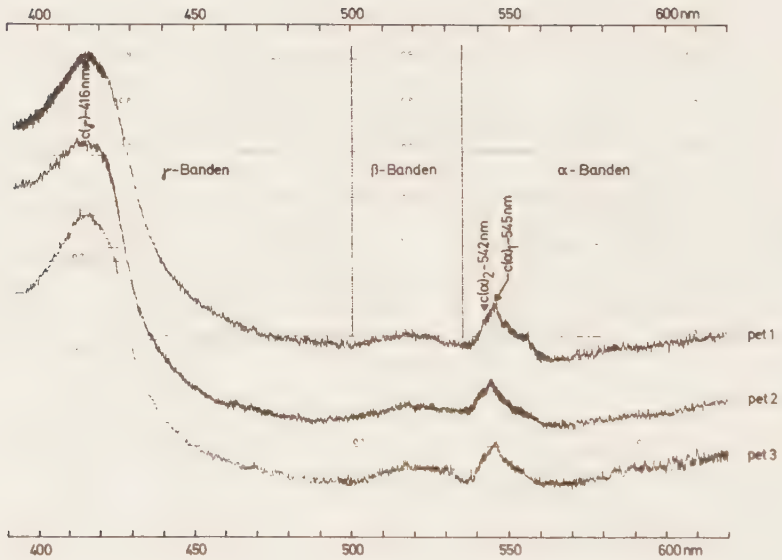
Figur 52 (links)

Schematische Darstellung der Entstehung submitochondrialer Partikel aus der inneren Mitochondrienmembran durch Ultraschall.



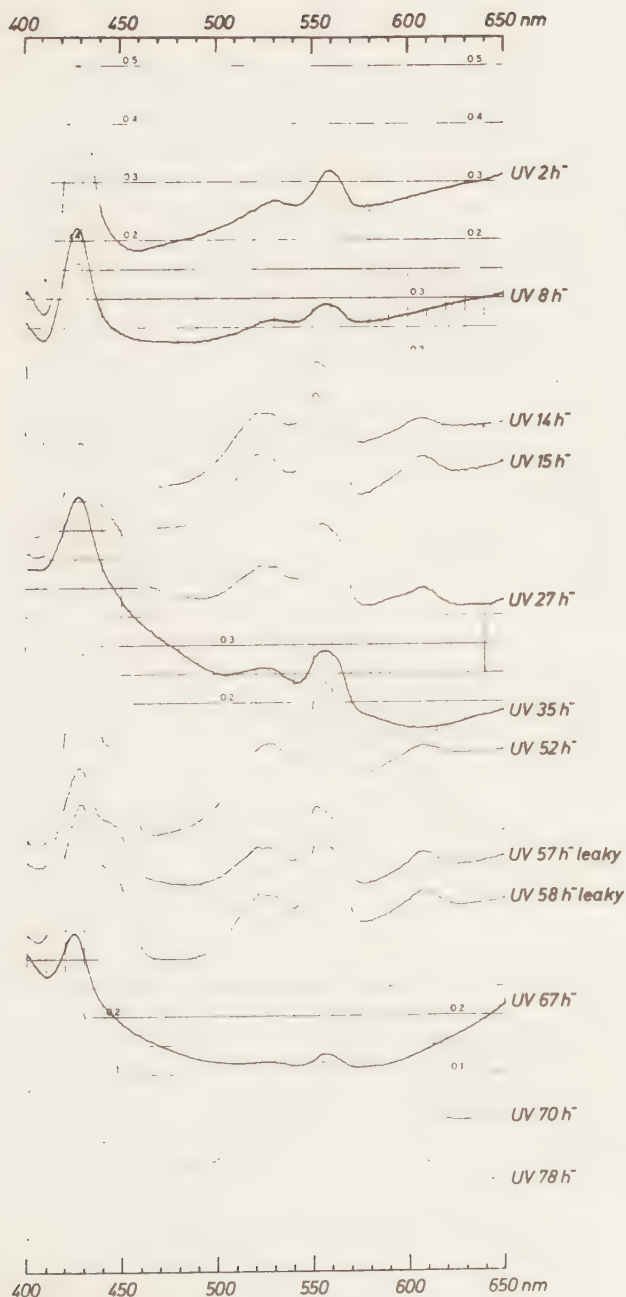
Figur 53

Absolute Tieftemperaturspektren ganzer Zellen vom Wildtyp 972h⁻ und von 8 atemungsdefekten Mutanten von *Schizosaccharomyces pombe*. (Cary 15)



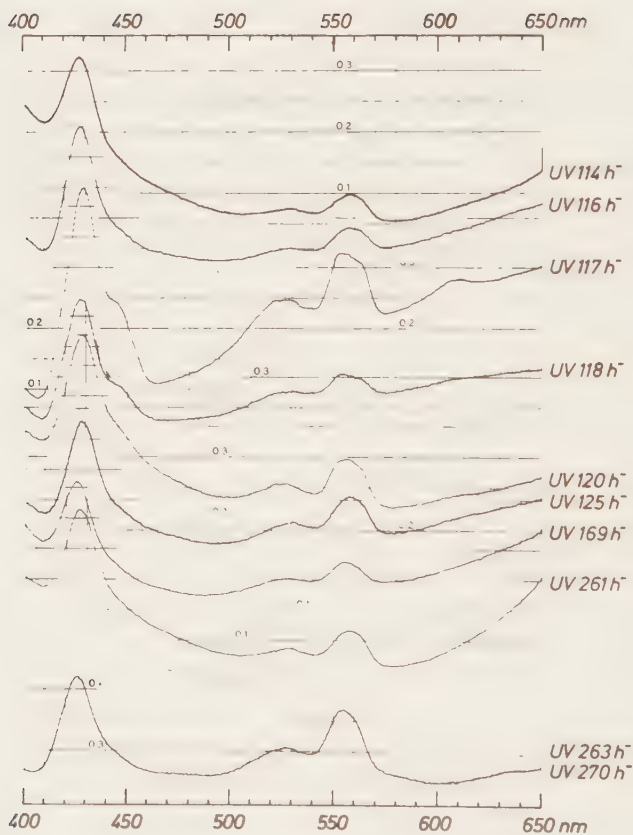
Figur 54

Absolute Tieftemperaturspektren ganzer
Zellen dreier atmungsdefekter Mutanten
von *Schizosaccharomyces pombe* (Cary 15)



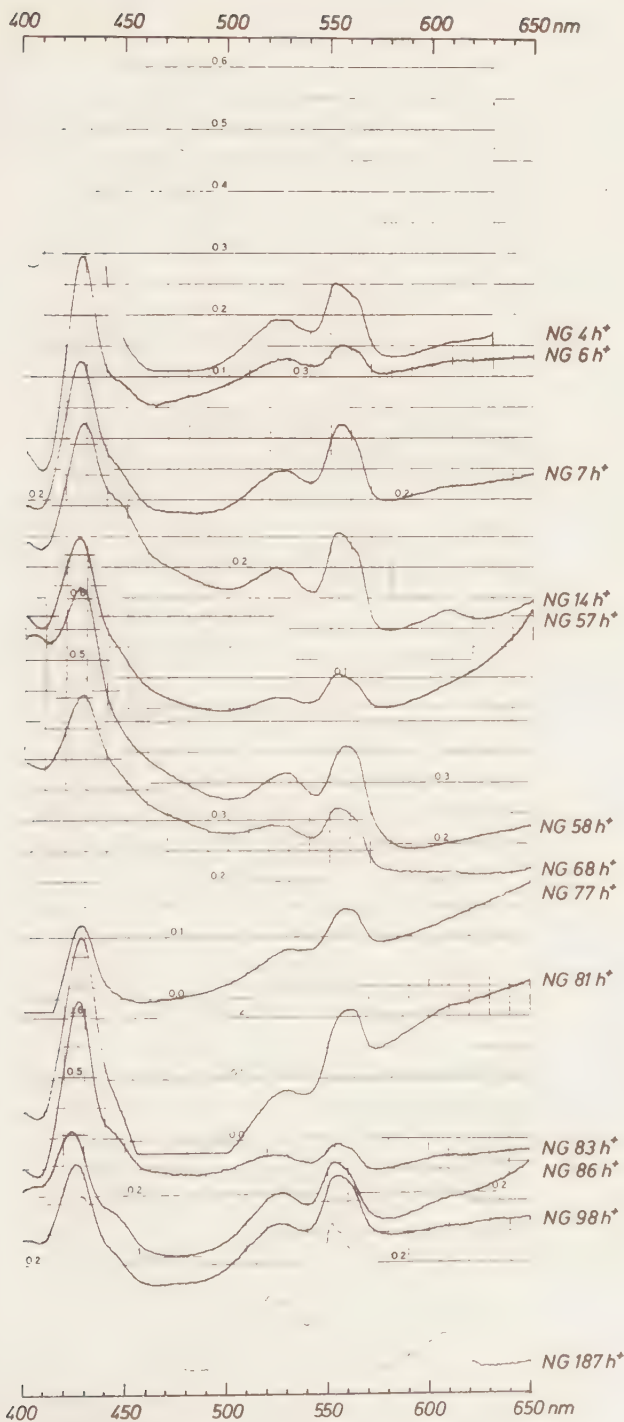
Figur 55

Differenzspektren differenziell gereinigter Mitochondrien atmungsdefekter Mutanten von *Schizosaccharomyces pombe*. Proteinwerte siehe Tabelle 18



Figur 56

Differenzspektren differentiell gereinigter Mitochondrien von 10 atmungsdefekten Mutanten von *Schizosaccharomyces pombe*. Die Basislinien sind hier nicht gezeigt, da sie nur sehr wenig Abweichung von der Geraden zeigen. Proteinwerte siehe Tabelle 18



Figur 57
Differenzspektren differenziell gereinigter Mitochondrien atmungsdefekter Mutanten von Schizosaccharomyces pombe. Proteinwerte siehe Tabelle 18



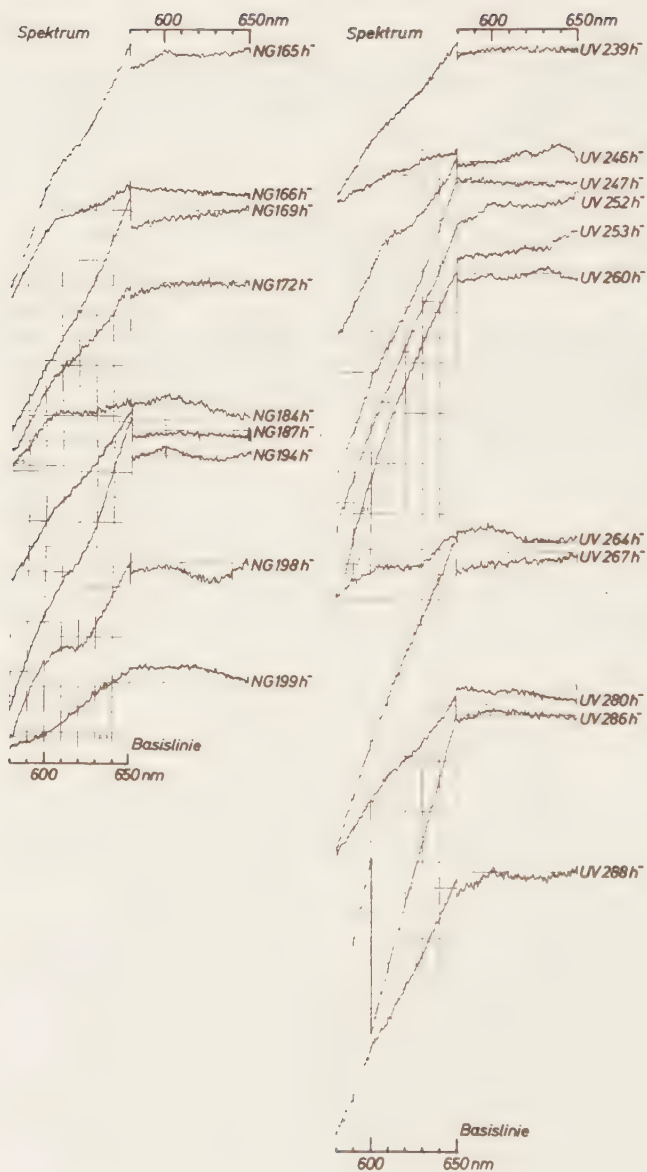
Figur 58

Differenzspektren differentiell gereinigter Mitochondrien von Wildtyp $88h^+$ und 17 Nitrosoguanidin- induzierten at-
mungsdefekten Mutanten von *Schizosaccharomyces pombe* im Bereich von 650 - 580 nm (Cytochrom a, a_3 - Region). Rechts neben den Spektren sind die entsprechenden Basis-
linien gezeigt. Proteinwerte siehe Tabelle 18.

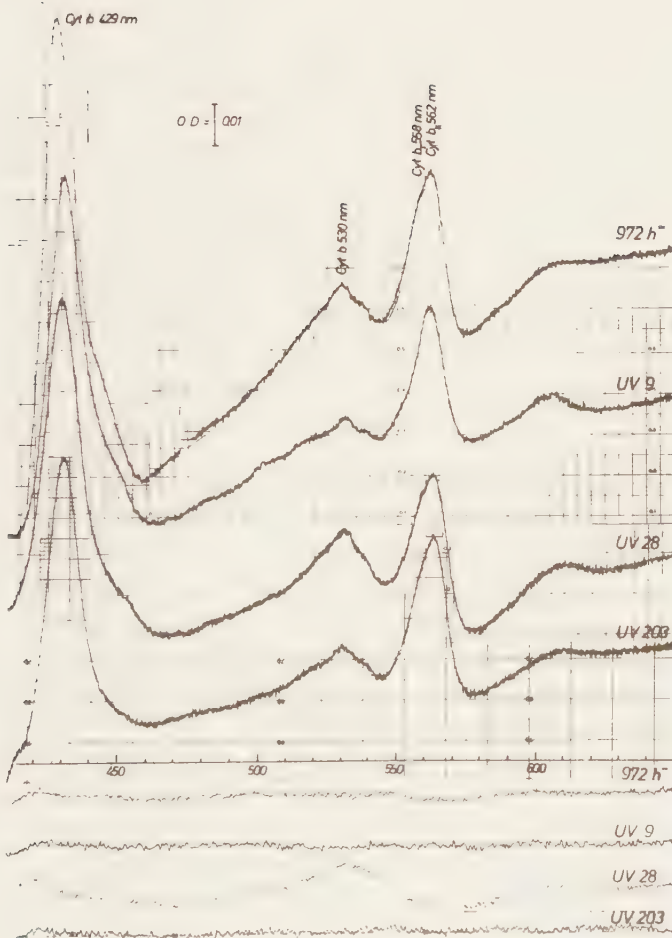
Figur 59

Differenzspektren der Cytochrom a, a_3 - Region (650 - 580 nm, Cytochrom a, a_3 bei 607 nm) differentiell gereinigter Mitochondrien von 20 atmungsdefekten Mutanten von *Schizosaccharomyces pombe*.

Proteinwerte siehe Tabelle 18.

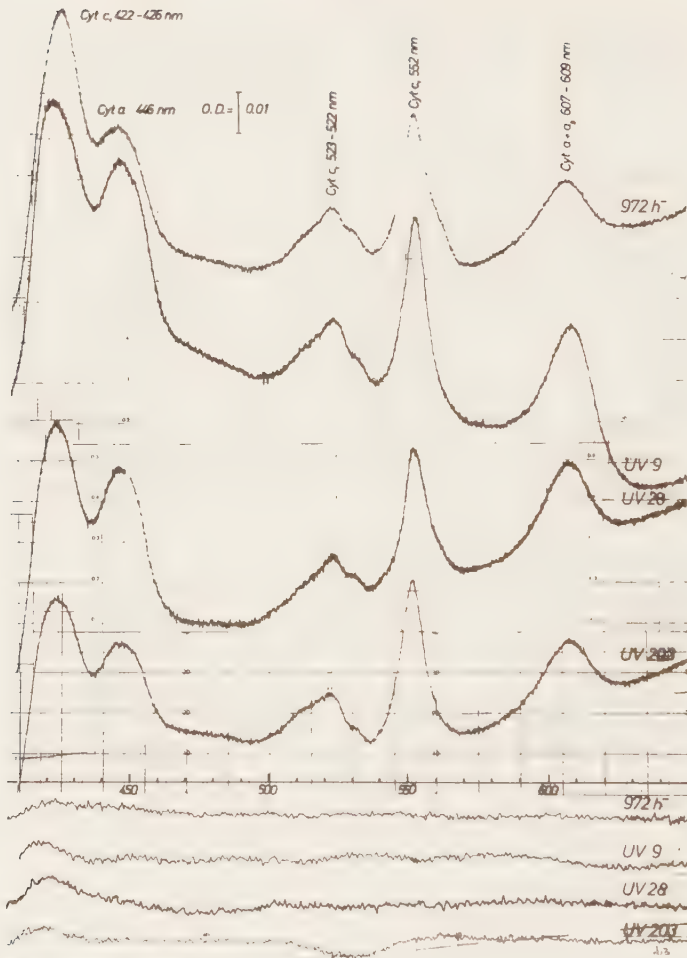


Figur 59



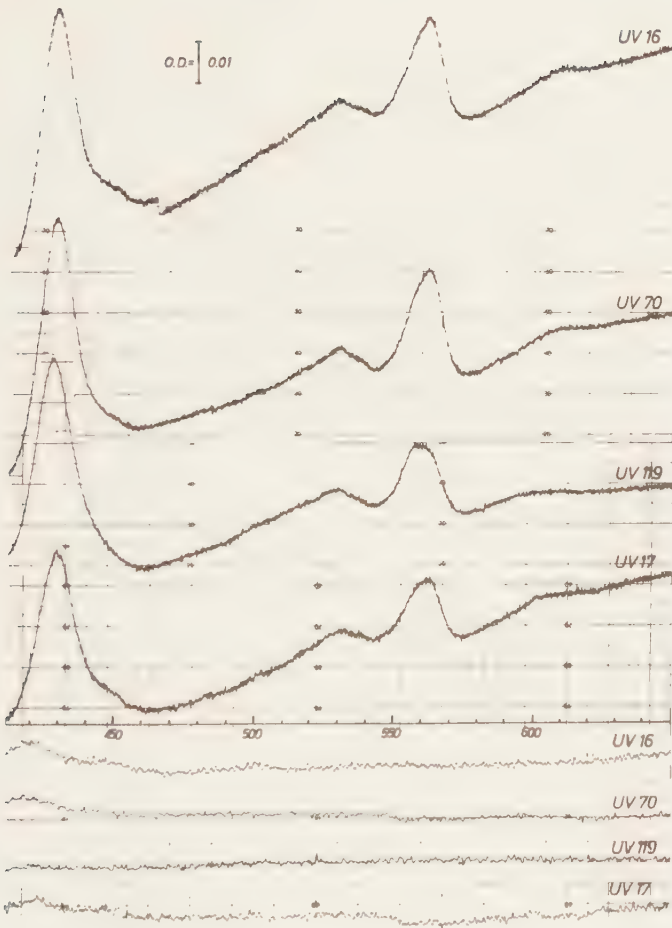
Figur 60

Differenzspektren von Cytochrom b 558 und b 562 von submitochondrialen Partikeln des Wildtyps 972h⁻ (14 mg Protein/ml) und der RD- Mutanten UV 9 (pet 12) (13 mg Protein/ml), UV 28 (pet 31)(12 mg Protein/ml) und UV 203 (pet 153)(15 mg Protein/ml). Darunter sind die entsprechenden Basislinien gezeigt.



Figur 61

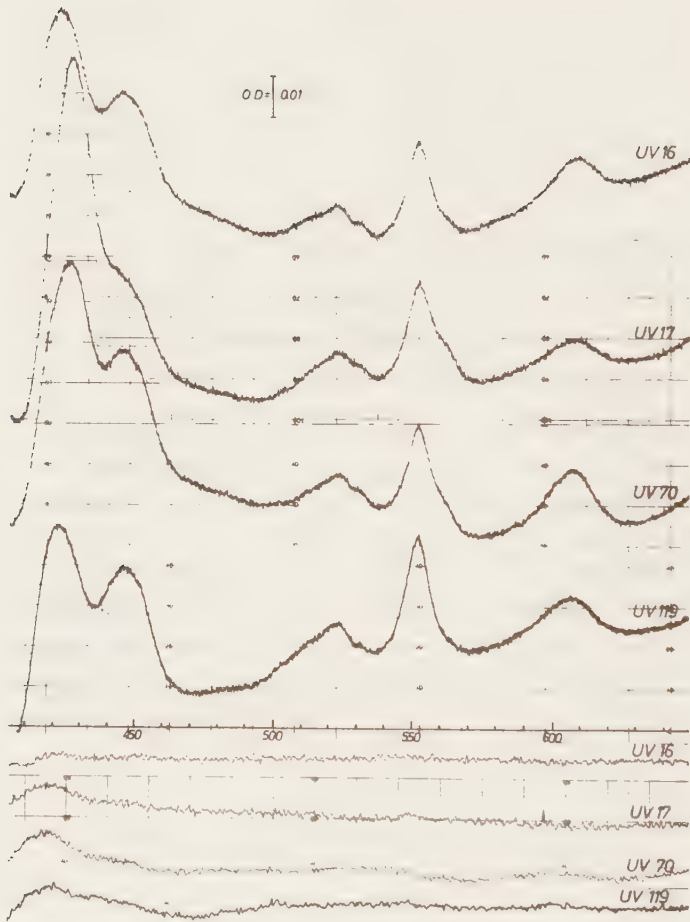
Differenzspektren von Cytochrom c_1 und $a.a_3$ von submitochondrialen Partikeln des Wildtyps 972h⁻ und der RD- Mutanten UV 9 (pet 12), UV 28 (pet 31) und UV 203 (pet 153). Die Proteinkonzentrationen sind die gleichen wie in Figur 60. Darunter sind die entsprechenden Basislinien gezeigt.



Figur 62

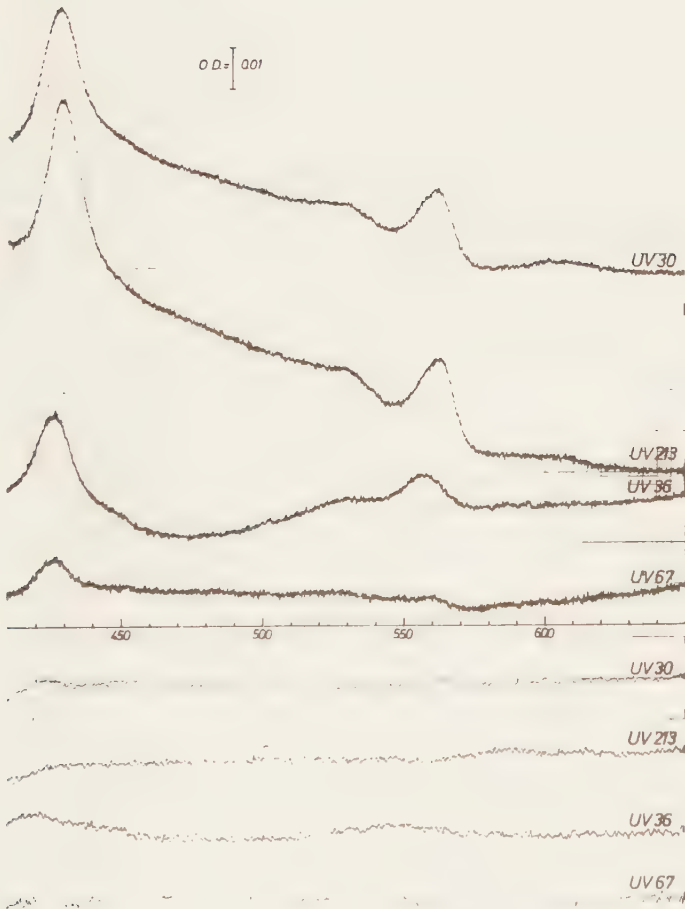
Differenzspektren von Cytochrom b- 558 und b- 562 von submitochondrialen Partikeln der RD- Mutanten UV 16 (pet 19)(12 mg Protein/ml), UV 70 (pet 71) (10 mg Protein/ml), UV 119 (pet 100)(12 mg Protein /ml) und UV 17 (pet 20)(15 mg Protein/ml).

Darunter sind die entsprechenden Basislinien gezeigt.



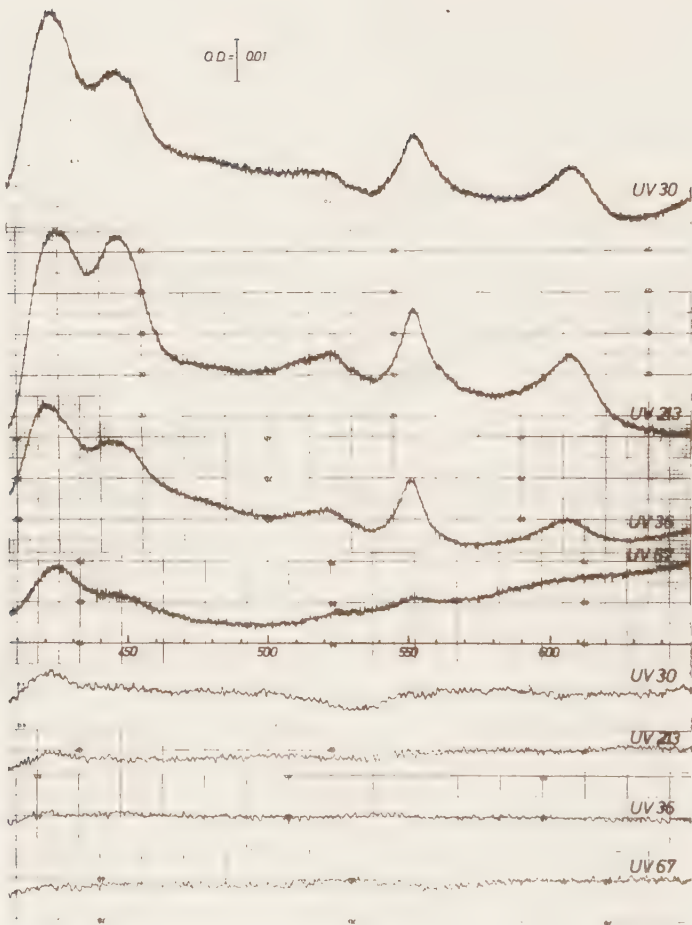
Figur 63

Differenzspektren von Cytochrom c_1 und a_3 von submitochondrialen Partikeln der RD- Mutanten UV 16 (pet 19), UV 17 (pet 20), UV 70 (pet 71) und UV 119 (pet 100). Die Proteinkonzentrationen sind dieselben wie in Figur 62. Darunter sind die entsprechenden Basislinien gezeigt.



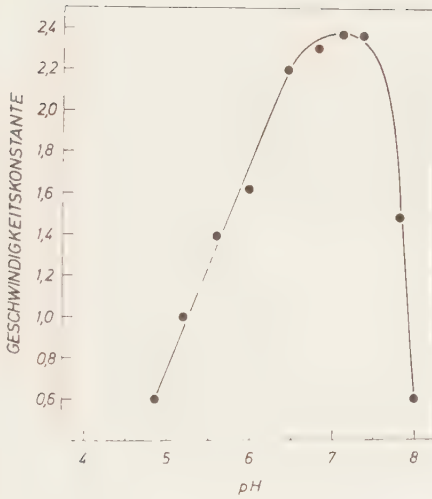
Figur 64

Differenzspektren von Cytochrom b 558 und b 562 von submitochondrialen Partikeln der RD- Mutanten UV 30 (pet 33)(18 mg Protein/ml), UV 213 (pet 161) (14 mg Protein/ml), UV 36 (pet 39)(15 mg Protein /ml) und UV 67 (pet 69)(30 mg Protein/ml). Darunter sind die entsprechenden Basislinien gezeigt.



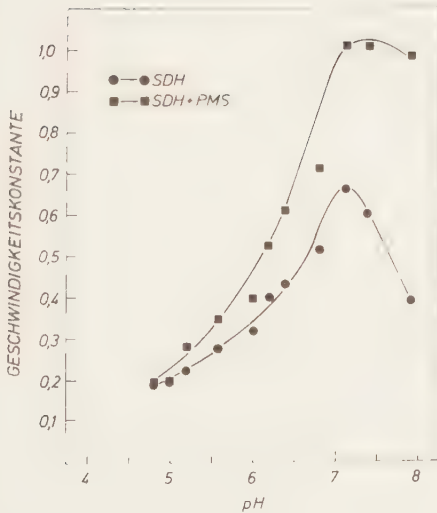
Figur 65

Differenzspektren von Cytochrom c_1 und $a.a_3$ von submitochondrialen Partikeln der RD- Mutanten UV 30 (pet 33), UV 213 (pet 161), UV 36 (pet 39) und UV 67 (pet 69). Die Proteinkonzentrationen sind dieselben wie in Figur 64. Darunter sind die entsprechenden Basislinien gezeigt.



Figur 66

Abhängigkeit der Cytochrom c-oxidase-Aktivität differentiell gereinigter Mitochondrien des Wildtyps 972h⁻ von *Schizosaccharomyces pombe* vom pH des Testgemisches

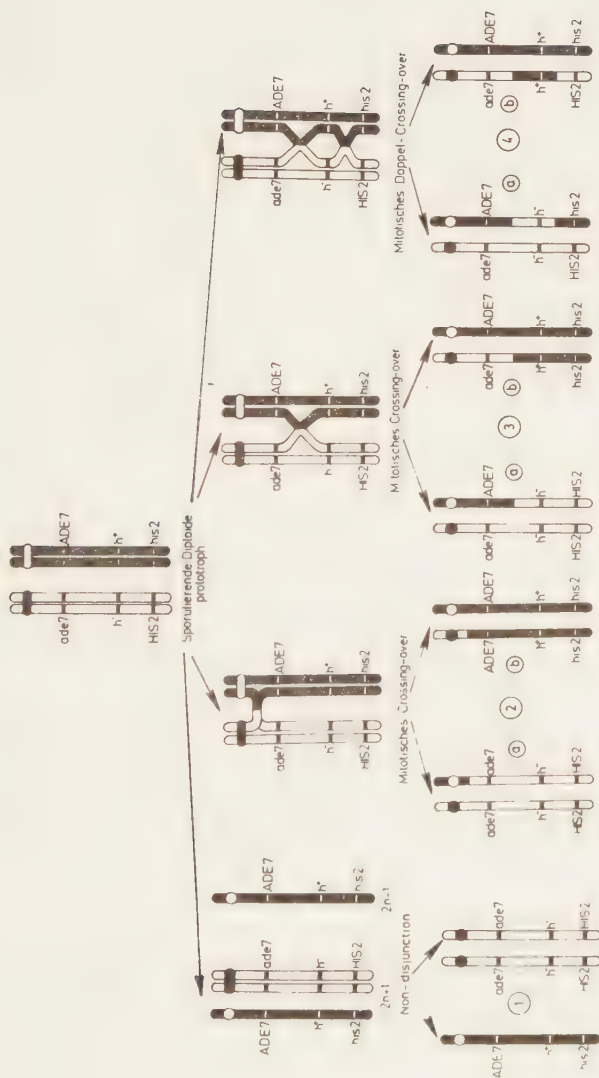


Figur 67

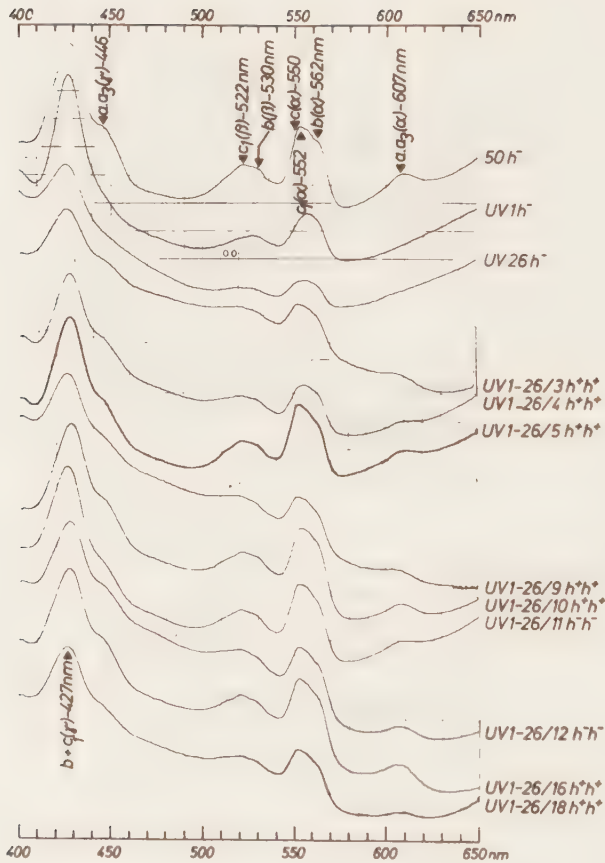
Abhängigkeit der Succinat- Cytochrom c- Reduktase- Aktivität ohne und mit Phenazinmethosulfat differentiell gereinigter Mitochondrien des Wildtyps 972h⁻ von *Schizosaccharomyces pombe* vom pH des Testgemisches. (siehe Abschnitt Methoden)

Figur 68

Schematische Darstellung der Entstehung stabiler nichtsporulierender Diploider bei *Schizosaccharomyces pombe* durch (1) Non- disjunction oder (2)(3)(4) mitotisches Crossing- over. Die Selektion der Diploiden erfolgt mittels der sich komplementierenden Auxotrophien *ade 7* und *his 2* auf dem Paarungstypchromosom (Chromosom II). 2a, 2b und 3b repräsentieren auxotrophe, 3a, 4a und 4b prototrophe Diploide nach mitotischem Crossing- over zwischen Centromer und Paarungstyplocus. Diploide, welche entweder beide parentalen oder beide rekombinanten Stränge enthalten, sind, da heterozygot für den Paarungstyp, nicht stabil.

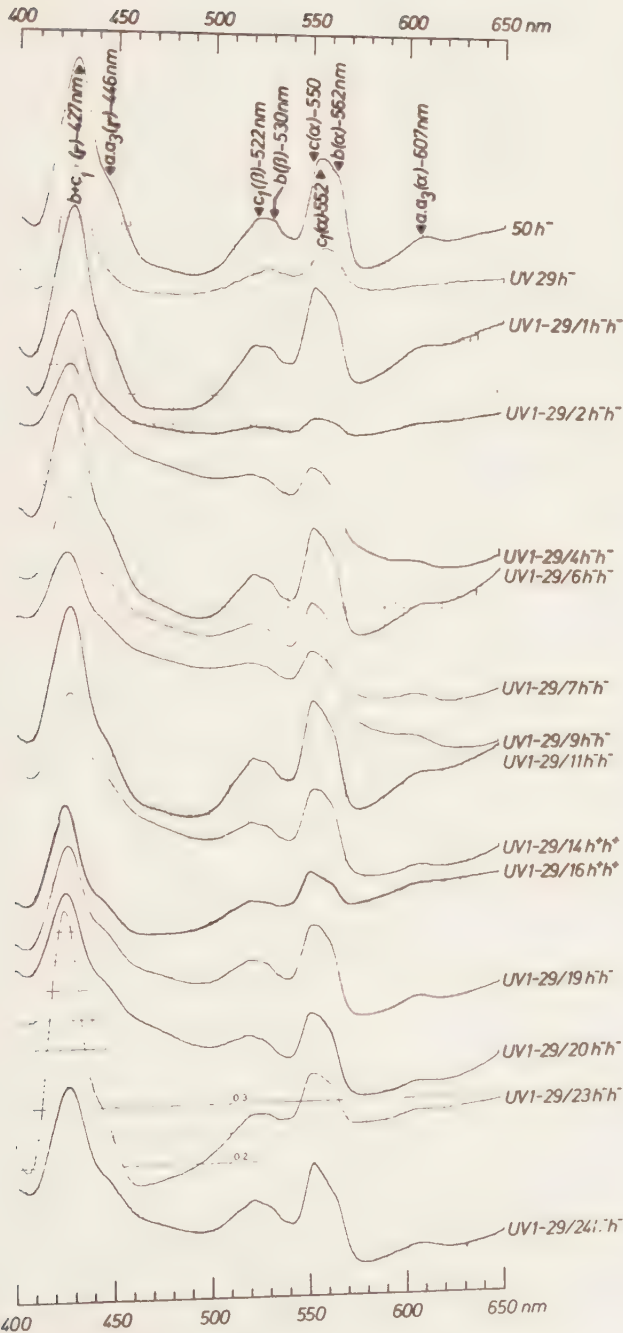


Figur 68



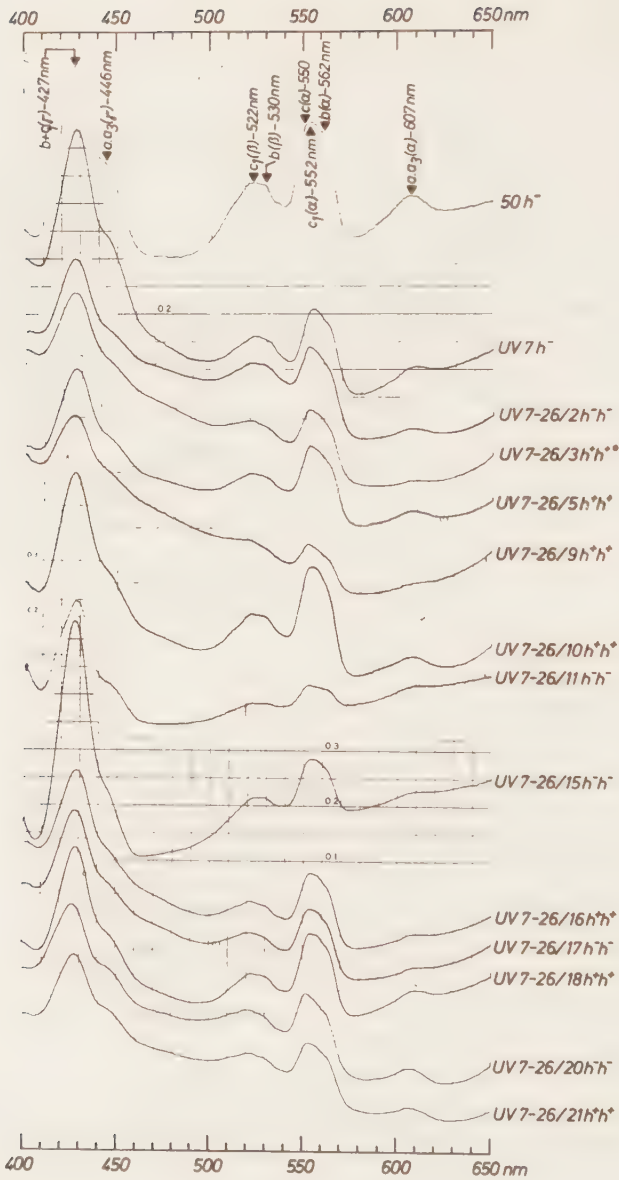
Figur 69

Differenzspektren differentiell gereinigter Mitochondrien stabiler Diploider aus den Mutanten UV 1 und UV 26 von *Schizosaccharomyces pombe* bei Raumtemperatur. Darüber ein Spektrum des Wildtyps 50h⁻. Proteinwerte siehe Tabelle 15.



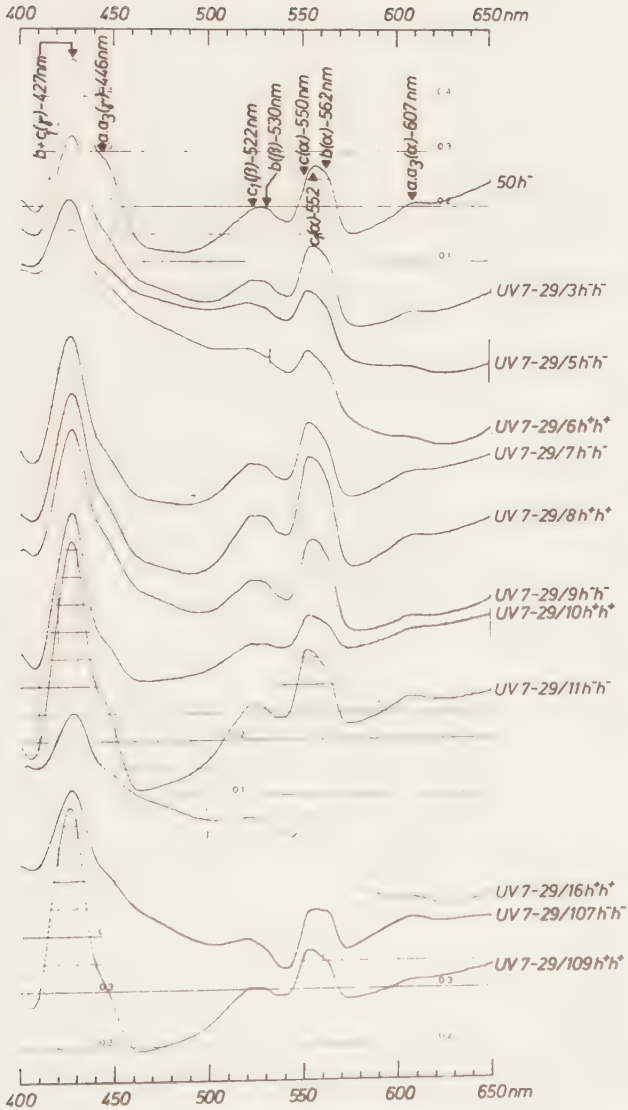
Figur 70

Differenzspektren
differentiell
gereinigter
Mitochondrien
stabiler Diploider
aus den Mutanten
UV 1 und UV 29
von *Schizosaccharomyces pombe*
bei Raumtemperatur.
Proteinwerte
siehe Tabelle 15.



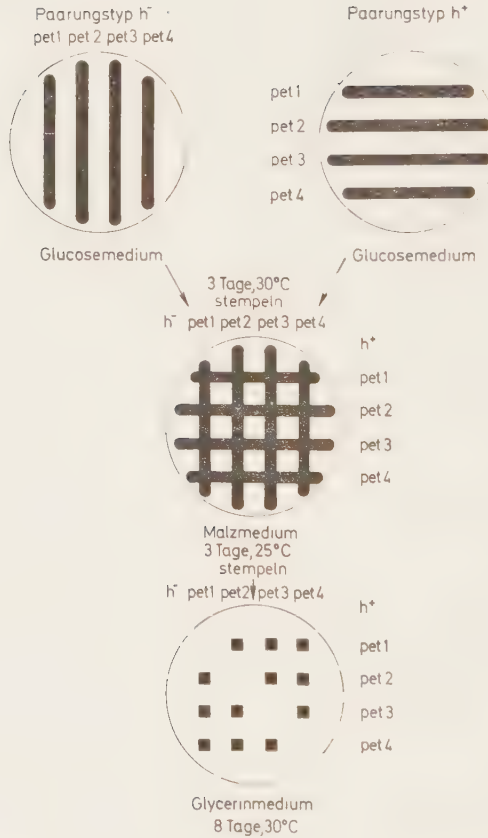
Figur 71

Differenzspektren differentiell gereinigter Mitochondrien stabiler Diploider aus den Mutanten UV 7 und UV 26 von *Schizosaccharomyces pombe* bei Raumtemperatur. Das Isolat UV 7-26/3 enthielt etwa 25% atmungsdefekte Haploide. Proteinwerte siehe Tabelle 15.



Figur 72

Differenzspektren differentiell gereinigter Mitochondrien stabiler Diploider aus den Mutanten UV 7 und UV 29 von *Schizosaccharomyces pombe* bei Raumtemperatur. Proteinwerte siehe Tabelle 15.



Figur 73

Schematische Darstellung der qualitativen Kreuzungsanalyse atmungsdefekter Mutanten untereinander (siehe genetische Methoden für *Schizosaccharomyces pombe* 9).

Figur 74

Darstellung der Ergebnisse der qualitativen Kreuzungsanalyse von 26 cytochromoxidase-defekten Mutanten untereinander nach der in Figur 73 dargestellten Methode.



sehr viele atmungskompetente Rekombinanten =
Rasen auf Glycerin.



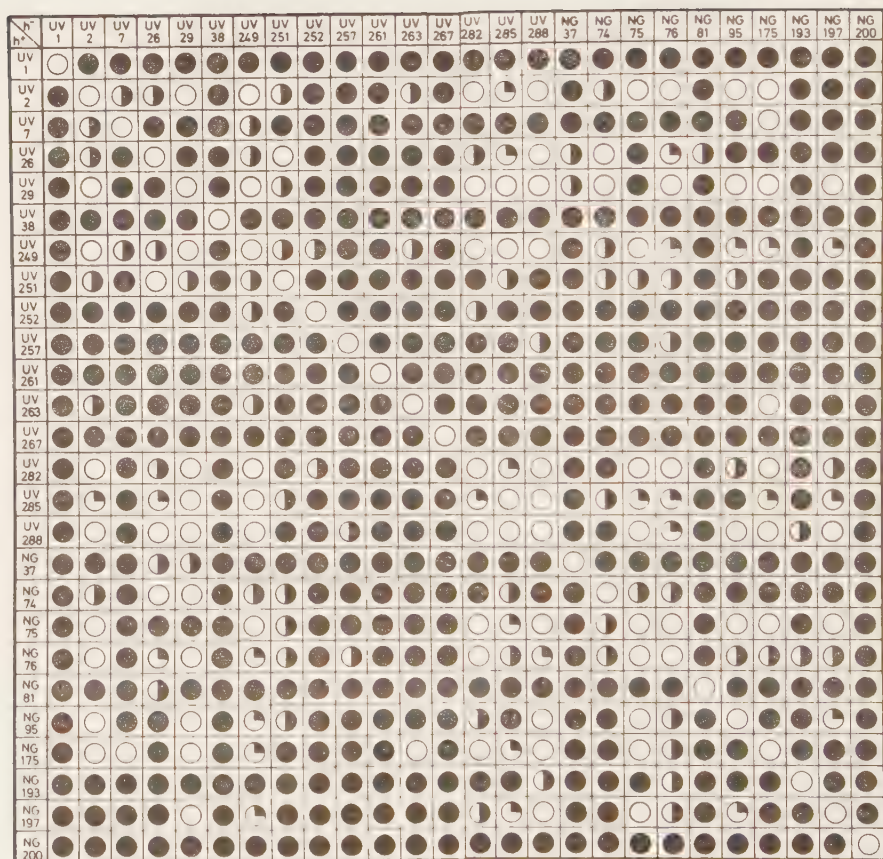
viele atmungskompetente Rekombinanten = etwa 20 - 100
Einzelkolonien, jedoch kein zusammenhängender Rasen
auf Glycerin.



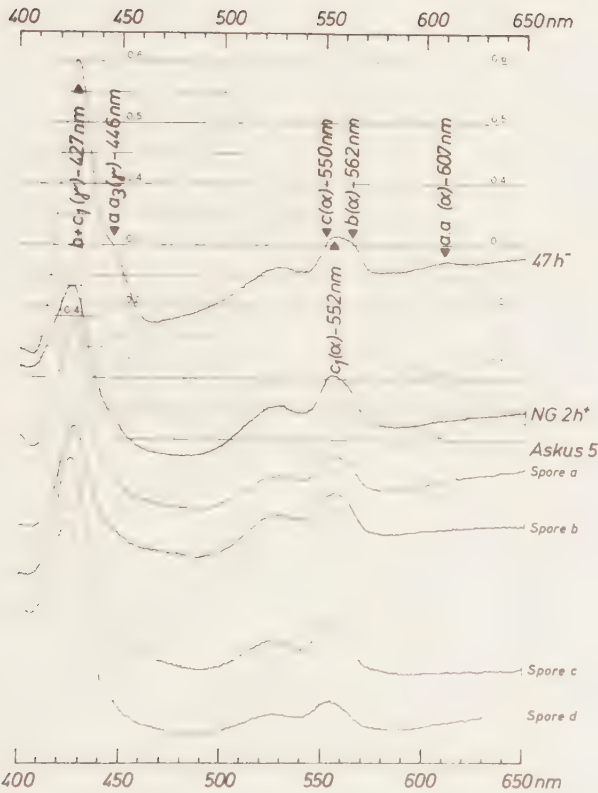
wenige atmungskompetente Rekombinanten = 5 - 20
Einzelkolonien auf Glycerin.



keine oder nur einzelne atmungskompetente Rekombinanten
(Revertanten?) = 0 - 5 Einzelkolonien auf Glycerin.



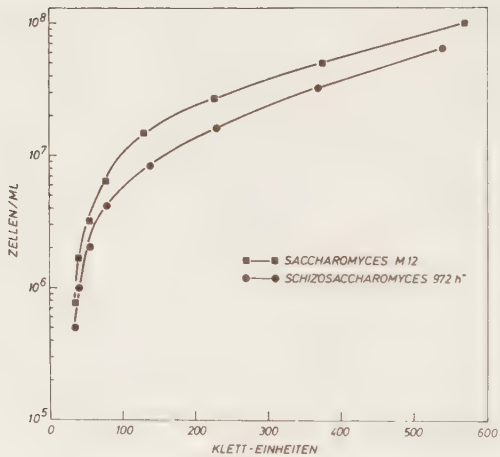
Figur 74



Figur 75

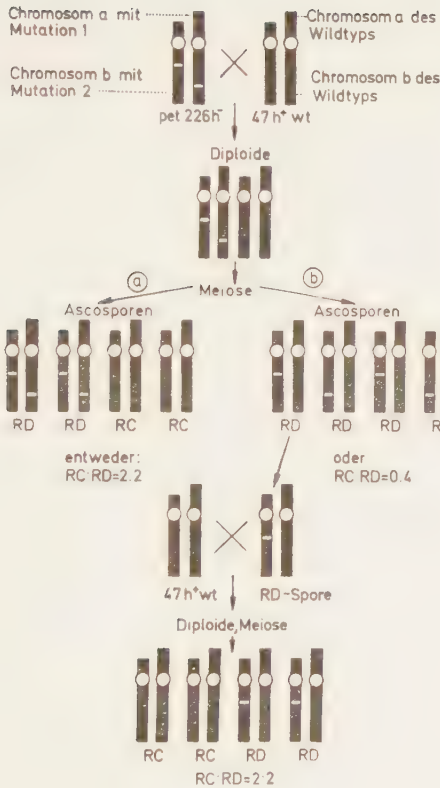
Differenzspektren differenziell gereinigter Mitochondrien des Wildtyps $47h^-$ und der atemungsdefekten Doppelmutante NG 2. Darunter Spektren differenziell gereinigter Mitochondrien aus Kulturen der 4 Sporen eines Askus aus einer Kreuzung von Wildtyp $47h^-$ und Mutante NG 2. Die Nachkommen sämtlicher 4 Sporen sind atemungsdefekt. Weitere Daten über diese Doppelmutante NG 2 siehe Tabellen 12 und 13.

Proteinwerte in mg/ml: $47h^-$: 9,2 mg, NG 2: 8,3 mg, Spore a: 9,8 mg, Spore b: 8,3 mg, Spore c: 9,4 mg, Spore d: 8,7 mg



Figur 76

Darstellung des Zusammenhangs von
Zelltiter und Klett- Einheiten für
Saccharomyces cerevisiae M 12 und
Schizosaccharomyces pombe 972h⁻



Figur 77

Schematische Darstellung der Rückkreuzung der Doppelmutante pet 226 mit dem Wildtyp und der Rückkreuzung einer atmungsdefekten Spore der F₁ mit dem Wildtyp.

Tabelle 1

Zusammenstellung der Medien für Schizosaccharomyces pombe und den für den Stamm 972 h⁻ erzielten Verdopplungszeiten und Endtitern.

Medium	Verdopplungszeit in Stunden	Endtiter Zellen/ml
Hefeextrakt- Vollmedium mit 3 % Glucose	2,5	2×10^8
Hefeextrakt- Vollmedium mit 3 % Glycerin, pH 6,5	6	8×10^7
Hefeextrakt- Vollmedium mit 3 % Glycerin, pH 4,5	4	8×10^7
Malzextrakt- Medium	2,5	8×10^7
Edinburgh- Minimalmedium 1	3	10^7
Edinburgh- Minimalmedium 2	2,8	4×10^7
Yeast- Nitrogen- Base mit KH ₂ PO ₄ +Asparagin+3 % Glu.	3	4×10^7
Minimalmedium nach Leupold mit 3 % Glucose	3	4×10^7

Tabelle 2

Wachstumshemmung des Stammes 972 h⁻ von Schizosaccharomyces pombe auf Hefeextrakt- Glucose- Medium durch verschiedene Mutagene.

Mutagen	Konzentration	Hemmhofgrösse
Diäthylsulfat	unverdünnt	3,2 cm (+)
	1 : 10	1,0 cm (+)
ICR - 170	Kristall	3,0 cm (+)
	2 mg/ml H ₂ O	3,0 cm
	1 : 10	1,3 cm
MMS	unverdünnt	6,5 cm
	1 : 10	3,0 cm (+)
	1 : 100	0,5 cm
Nitrosoguanidin	Kristall	6,5 cm
	4 mg/ml H ₂ O	3,0 cm (+)
	1 : 10	1,3 cm

Die Menge der jeweils aufgetragenen Lösungen beträgt 0,05 ml.
Die später angewandten Konzentrationen sind mit (+) bezeichnet.

Tabelle 3

Zusammengefasste Ergebnisse der Freisporanalysen und Tetradenanalysen im Rückkreuzungsverfahren.

Abkürzungen:

RC (respiratory competent) = atmungskompetent

RD (respiratory deficient) = atmungsdefekt

+ Rekombinantenklasse vorhanden, jedoch nicht zahlenmässig bestimmt.

(+) zwei unabhängige Kreuzungen

Tabelle 3

pet 4 ade7 x 88h⁺ his2

RC his2	RC ade7	RD his2	RD ade7
1808	1263	1253	1272
32	23	22	23 %

pet 5 ade7 x 88h⁺ his2

RC his2	RC ade7	RD his2	RD ade7
1068	840	840	823
30	24	24	22 %

pet 6 ade7 x 88h⁺ his2

RC his2	RC ade7	RD his2	RD ade7
738	399	405	413
38	20	21	21 %

pet 7 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
149	395	152	392	+	+
27	63	28	72 %		

pet 8 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
78	296	106	268	+	+
21	79	28	72 %		

pet 9 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
61	106	62	105	+	+
37	63	37	63 %		

pet 10 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
137	172	135	174	+	+
44	56	44	56 %		

pet 11 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
12	32	22	22	+	+
27	63	50	50 %		

pet 12 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
7	14	8	13	+	+
33	67	38	62 %		

pet 13 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
192	161	141	212	+	+
54	46	40	60 %		

Tabelle 3

pet 14 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
201	440	192	449	+	+
31	69	30	70 %		

pet 15 ade7 x 88h⁺ his 2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
146	383	147	382	+	+
28	72	28	72 %		

pet 16 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
38	113	40	111	+	+
25	75	26	74 %		

pet 17 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
56	194	58	192	+	+
22	78	23	77 %		

pet 18 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
21	134	21	134	+	+
14	86	14	86 %		

pet 19 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
71	90	75	86	+	+
44	56	47	53 %		

pet 20 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
84	88	76	96	+	+
49	51	44	56 %		

pet 21 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
107	154	107	154	+	+
41	59	41	59 %		

pet 22 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
222	384	228	378	+	+
37	63	38	62 %		

pet 23 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
195	373	199	378	+	+
34	66	34	66 %		

Tabelle 3

pet 24 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
290	300	310	280	+	+
49	51	53	47 %		

pet 25 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
146	331	146	331	+	+
31	69	31	69 %		

pet 26 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
411	582	432	561	+	+
41	59	44	56 %		

pet 27 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
216	360	233	343	+	+
38	62	40	60 %		

pet 28 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
127	224	132	219	+	+
36	64	38	62 %		

pet 29 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
207	237	207	237	+	+
47	53	47	53 %		

pet 30 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
287	499	307	479	+	+
37	63	39	61 %		

pet 31 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
285	407	292	400	+	+
41	59	42	58 %		

pet 32 ade7 x 88h⁺ his2

RC his2	RC ade7	RD his2	RD ade7
3981	2163	846	615
52	28	11	9 %

pet 33 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
125	110	113	122	+	+
53	47	48	52 %		

Tabelle 3

pet 34 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
136	347	150	333	+	+
28	72	31	69 %		

pet 35 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
209	368	205	372	+	+
36	64	36	64 %		

pet 36 ade7 x 88h⁺ his2

RC his2	RC ade7	RD his2	RD ade7
1295	1137	1329	1233
26	27	26	21 %

pet 37 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
69	273	48	294	+	+
20	80	14	86 %		

pet 38 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
74	417	69	422	+	+
15	85	14	86 %		

pet 39 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
121	269	122	268	+	+
31	69	31	69 %		

pet 40 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
155	513	110	558	+	+
23	77	16	84 %		

pet 41 ade7 x 88h⁺ his2 (+)

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
69	462	57	474	+	+
13	87	11	89 %		

pet 41 ade7 x 88h⁺ his2 (+)

RC his2	RC ade7	RD his2	RD ade7
1165	1001	967	1047
28	24	23	25 %

pet 42 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
30	21	25	26	+	+
59	41	49	51 %		

Tabelle 3

pet 43 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
164	350	148	366	+	+
32	68	29	71 %		

pet 44 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
66	58	49	75	+	+
53	47	60	40 %		

pet 45 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
130	386	149	267	+	+
31	69	36	64 %		

pet 47 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
46	33	44	35	+	+
58	42	56	44 %		

pet 48 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
125	363	89	399	+	+
26	74	18	82 %		

pet 49 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
28	399	29	398	+	+
7	93	7	93 %		

pet 50 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
137	389	127	399	+	+
26	74	24	76 %		

pet 51 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
67	536	58	545	+	+
11	89	10	90 %		

pet 52 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
6	115	10	111	+	+
5	95	8	92 %		

pet 53 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
91	210	102	199	+	+
30	70	34	66 %		

Tabelle 3

pet 54 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
167	528	181	514	+	+
24	76	26	74 %		

pet 55 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
87	267	78	276	+	+
25	75	22	78 %		

pet 56 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
85	400	77	408	+	+
18	82	16	84 %		

pet 57 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
36	204	34	206	+	+
15	85	14	86 %		

pet 58 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
174	652	165	661	+	+
21	79	20	80 %		

pet 59 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
128	313	119	322	+	+
29	71	27	73 %		

pet 60 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
70	360	62	368	+	+
16	84	14	86 %		

pet 61 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
572	470	563	479	+	+
55	45	45	46 %		

pet 62 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
22	91	20	93	+	+
19	81	18	82 %		

pet 63 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
49	176	28	197	+	+
22	78	12	88 %		

Tabelle 3

pet 100 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
332	321	328	325	+	+
51	49	50	50 %		

pet 246 his2 x 50h⁻ ade7

RC	RD	ade7	his2	RC his2	RD ade7
10	7	15	16	+	+
59	41	48	52 %		

pet 247 his2 x 50h⁻ ade7

RC	RD	ade7	his2	RC his2	RD ade7
150	3	133	43	+	+
98	2	76	24 %		

pet 248 his2 x 50h⁻ ade7

RC	RD	ade7	his2	RC his2	RD ade7
10	10	12	9	+	+
50	50	57	43 %		

pet 249 his2 x 50h⁻ ade7

RC	RD	ade7	his2	RC his2	RD ade7
76	11	57	51	+	+
87	13	53	47 %		

pet 250 his2 x 50h⁻ ade7

RC	RD	ade7	his2	RC his2	RD ade7
52	48	54	46	+	+
53	48	54	46 %		

pet 252 his2 x 50h⁻ ade7

RC	RD	ade7	his2	RC his2	RD ade7
131	91	81	143	+	+
58	42	64	36 %		

pet 254 his2 x 50h⁻ ade7

RC	RD	ade7	his2	RC his2	RD ade7
18	11	21	8	+	+
62	38	72	28 %		

pet 255 his2 x 50h⁻ ade7

RC	RD	ade7	his2	RC his2	RD ade7
113	3	81	35	+	+
97	3	70	30 %		

pet 256 his2 x 50h⁻ ade7

RC	RD	ade7	his2	RC his2	RD ade7
49	29	40	38	+	+
63	37	51	49 %		

Tabelle 3

pet 257 ade7 x 88h⁺ his2

RC	RD	his2	ade7	RC ade7	RD his2
26	6	27	5	+	+
81	19	84	16 %		

pet 258 ade7 x 975h⁺ wt

RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt
20	8	19	9	+	+
71	29	68	32 %		

pet 259 ade7 x 975h⁺ wt

RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt
12	14	18	18	+	+
46	54	50	50 %		

pet 260 ade7 x 975h⁺ wt

RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt
905	197	-	-	-	-
82	18	-	- %		

pet 261 ade7 x 975h⁺ wt

RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt
373	35	303	160	+	+
91	9	65	35 %		

pet 263 ade7 x 975h⁺ wt

RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt
22	6	28	10	+	+
79	21	74	26 %		

pet 265 ade7 x 975h⁺ wt

RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt
249	126	264	144	+	+
66	34	65	35 %		

pet 266 ade7 x 975h⁺ wt

RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt
88	46	99	69	+	+
66	34	59	41 %		

pet 268 ade7 x 975h⁺ wt

RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt
96	53	103	60	+	+
64	36	63	37 %		

pet 269 ade7 x 975h⁺ wt

RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt
13	4	14	2	+	+
76	24	82	18 %		

Tabelle 3

<u>pet 271</u> ade7 x 975h ⁺ wt						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
143	26	143	44	+	+	
55	45	76	24 %			
<u>pet 273</u> ade7 x 975h ⁺ wt						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
213	233	218	289	+	+	
48	52	43	57 %			
<u>pet 275</u> ade7 x 975h ⁺ wt						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
15	14	23	10	+	+	
52	48	70	30 %			
<u>pet 276</u> ade7 x 975h ⁺ wt						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
207	27	132	109	+	+	
88	12	94	6 %			
<u>pet 277</u> ade7 x 975h ⁺ wt						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
26	10	35	3	+	+	
72	28	92	8 %			
<u>pet 278</u> ade7 x 975h ⁺ wt						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
80	17	75	24	+	+	
82	16	76	24 %			
<u>pet 279</u> ade7 x 975h ⁺ wt						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
77	15	74	23	+	+	
84	16	76	24 %			
<u>pet 280</u> ade7 x 975h ⁺ wt						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
147	13	109	42	+	+	
91	9	72	28 %			
<u>pet 281</u> ade7 x 975h ⁺ wt						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
42	13	40	14	+	+	
76	24	74	26 %			
<u>pet 283</u> ade7 x 975h ⁺ wt						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
87	19	88	23	+	+	
83	17	79	21 %			

Tabelle 3

<u>pet 285 ade7 x 975h⁺ wt</u>						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
63	20	64	22	+	+	
76	24	74	26 %			
<u>pet 288 ade7 x 975h⁺ wt</u>						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
94	29	92	35	+	+	
77	23	73	27 %			
<u>pet 289 ade7 x 975h⁺ wt</u>						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
232	47	240	73	+	+	
83	17	76	24 %			
<u>pet 290 ade7 x 975h⁺ wt</u>						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
92	4	104	10	+	+	
96	4	91	9 %			
<u>pet 291 ade7 x 975h⁺ wt</u>						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
151	45	125	144	+	+	
78	22	46	54 %			
<u>pet 293 ade7 x 975h⁺ wt</u>						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
168	9	180	8	+	+	
94	6	95	5 %			
<u>pet 294 ade7 x 975h⁺ wt</u>						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
9	15	9	9	+	+	
37	63	50	50 %			
<u>pet 296 ade7 x 975h⁺ wt</u>						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
38	35	30	44	+	+	
52	48	40	60 %			
<u>pet 297 ade7 x 975h⁺ wt</u>						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
368	60	343	145	+	+	
85	15	70	30 %			
<u>pet 298 his2 x 972h⁻ wt</u>						
RC	RD	wt	his2	RC his2	RD wt	
188	41	141	90	+	+	
82	18	61	39 %			

Tabelle 3

<u>pet 299</u> ade7 x 975h ⁺ wt					
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt
78	84	94	71	+	+
48	52	56	44 %		
<u>pet 301</u> ade7 x 975h ⁺ wt					
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt
13	72	45	52	+	+
15	85	46	54 %		
<u>pet 302</u> his2 x 972h ⁻ wt					
RC	RD	wt	his2	RC his2	RD wt
119	53	56	119	+	+
69	31	32	68 %		
<u>pet 303</u> ade7 x 975h ⁺ wt					
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt
66	87	85	66	+	+
43	57	56	44 %		
<u>pet 304</u> ade7 x 975h ⁺ wt					
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt
273	44	306	50	+	+
86	14	85	15 %		
<u>pet 305</u> ade7 x 975h ⁺ wt					
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt
245	37	264	70	+	+
86	14	79	21 %		
<u>pet 306</u> ade7 x 975h ⁺ wt					
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt
115	12	104	36	+	+
91	9	74	26 %		
<u>pet 307</u> ade7 x 975h ⁺ wt					
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt
222	24	235	43	+	+
90	10	85	15 %		
<u>pet 308</u> ade7 x 975h ⁺ wt					
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt
238	23	271	34	+	+
91	9	89	11 %		
<u>pet 309</u> ade7 x 975h ⁺ wt					
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt
180	73	175	126	+	+
71	29	58	42 %		

Tabelle 3

<u>pet 310</u> ade7 x 975h ⁺ wt						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
508	135	512	241	+	+	
79	21	68	32 %			
<u>pet 311</u> ade7 x 975h ⁺ wt						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
55	29	62	24	+	+	
65	35	73	27 %			
<u>pet 312</u> ade7 x 975h ⁺ wt						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
116	32	106	42	+	+	
78	22	72	28 %			
<u>pet 313</u> ade7 x 975h ⁺ wt						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
289	86	283	110	+	+	
77	23	72	28 %			
<u>pet 314</u> ade7 x 975h ⁺ wt						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
114	22	112	55	+	+	
84	16	67	33 %			
<u>pet 315</u> ade7 x 975h ⁺ wt						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
206	104	183	149	+	+	
66	34	55	45 %			
<u>pet 316</u> ade7 x 975h ⁺ wt						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
212	34	212	68	+	+	
86	14	76	24 %			
<u>pet 317</u> ade7 x 975h ⁺ wt						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
113	53	121	73	+	+	
68	32	62	38 %			
<u>pet 318</u> ade7 x 975h ⁺ wt						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
37	1	34	5	+	-	
97	3	87	13 %			
<u>pet 319</u> ade7 x 975h ⁺ wt						
RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt	
71	60	66	84	+	+	
54	46	44	56 %			

Tabelle 3

pet 320 ade7 x 975h⁺ wt

RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt
157	65	152	95	+	+
70	30	61	39 %		

pet 333 his2 x 972h⁻ wt

RC	RD	wt	his2	RC his2	RD wt
1750	1867	1723	1894	+	+
48	52	48	52 %		

pet 348 ade7 x 972h⁻ wt

RC	RD	wt	ade7	RC ade7	RD wt
1716	702	1715	703	+	+
71	29	71	29 %		

pet 372 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
968	388
71	29 %

pet 399 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
174	177
50	50 %

pet 373 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
164	164
50	50 %

pet 400 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
455	491
48	52 %

pet 374 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
395	169
70	30 %

pet 405 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
397	258
60	40 %

pet 376 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
83	15
85	15 %

pet 406 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
1766	1081
62	38 %

pet 386 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
1082	207
84	16 %

pet 407 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
466	84
84	16 %

pet 387 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
412	419
50	50 %

pet 408 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
543	586
48	52 %

pet 392 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
1011	1268
44	56 %

pet 414 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
424	458
48	52 %

Tabelle 3

pet 415 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
35	25
58	42 %

pet 416 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
2239	1712
57	43 %

pet 417 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
1865	1771
51	49 %

pet 418 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
585	511
53	47 %

pet 419 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
151	66
70	30 %

pet 420 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
439	422
51	49 %

pet 497 leu1 x 975h⁺ wt

RC	RD	wt
2347	192	2345
91	9	91

pet 424 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
719	2
99	1 %

pet 425 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
889	592
60	40 %

pet 426 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
417	747
64	36 %

pet 427 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
1141	1261
48	52 %

pet 428 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
371	345
51	49 %

pet 429 wt x 975h⁺ wt

RC	RD
200	2
99	1 %

leu1
194
9 %

RC leu1	RD wt
+	+

Tabelle 3

pet Nr.	Kreuzungs- partner	Zahl der Tetraden	Aufspaltung RC:RD
pet 226 h ⁻	975h ⁺ wt	1	3 : 1
		1	2 : 2
		2	1 : 3
	47h ⁺ ade6	1	0 : 4
		5	2 : 2
		14	1 : 3
pet 226 h ⁺	972h ⁻ wt	5	0 : 4
		9	2 : 2
		2	0 : 4
	47h ⁻ ade6	3	2 : 2
	245h ⁻ his2	4	2 : 2
	250h ⁻ ade6	1	1 : 3
2		2 : 2	
1		0 : 4	
pet 227 h ⁻	975h ⁺ wt	9	2 : 2
		3	1 : 2
	88h ⁺ his2	1	2 : 2
		1	2 : 1
		4	1 : 2
	pet 228 h ⁻	975h ⁺ wt	3
88h ⁺ his2		1	2 : 1
		1	1 : 2
pet 229 h ⁻	88h ⁺ his2	1	2 : 1
		5	1 : 2
pet 230 h ⁻	975h ⁺ wt	3	2 : 2
pet 232 h ⁻	975h ⁺ wt	2	2 : 2
		3	1 : 3
	250h ⁺ ade6	11	2 : 2
		1	1 : 3
pet 233 h ⁻	88h ⁺ his2	4	2 : 2
pet 241 h ⁻	975h ⁺ wt	4	2 : 2
pet 242 h ⁻	88h ⁺ his2	3	2 : 2
pet 243 h ⁻	88h ⁺ his2	1	2 : 2
		5	1 : 3
pet 244 h ⁻	88h ⁺ his2	3	3 : 1
		2	2 : 2
pet 245 h ⁺	250h ⁻ ade6	4	2 : 2
pet 247 h ⁺	972h ⁻ wt	2	3 : 1
pet 264 h ⁻	975h ⁺ wt	1	2 : 1
pet 286 h ⁻	975h ⁺ wt	1	2 : 2
		2	1 : 2
pet 287 h ⁻	975h ⁺ wt	5	2 : 2
		1	1 : 2

Tabelle 4

TTC - Toleranz atmungsdefekter und atmungskompetenter Zellen
des Stammes A 1327 A von Saccharomyces cerevisiae

TTC (mg/l)	Anzahl plattierter Zellen	Koloniezahl (+)	Atmungs- defekte (+)
0	200	170	14
10	200	173	15
50	200	16	14
100	200	12	12
150	200	13	13
200	200	12	12

(+) Mittelwert von 5 Platten

Tabelle 5

Biochemische Charakterisierung TTC - resistenter Mutanten
von Schizosaccharomyces pombe

Mutante	Ausgangs- stamm	Induktion	Zeit	genetische Analyse	Farbe auf TTC	Succ. - Cyt. c- Reduktase	Succ. - Cyt. c- Reduktase+PMS	NADH-Menadion- Reduktase	Succ. - Menadion- Reduktase	Cytochrom - oxidase
BR 1	972h ⁻	NG	35'	R	rot	77	97	49	114	56
BR 2	972h ⁻	NG	35'	R	rot	11	60	51	60	69
Br 4	972h ⁻	NG	35'	R	rosa	63	88	15	64	87
Br 5	972h ⁻	NG	35'	-	rosa	10	27	25	12	10
Br 6	972h ⁻	NG	35'	R	rosa	63	82	99	86	86
Br 7	972h ⁻	NG	35'	R	rosa	91	94	73	99	73
Br 8	972h ⁻	NG	35'	R	rosa	5	7	43	21	18
Br 9	972h ⁻	NG	35'	-	rosa	36	84	68	90	41
BR 10	972h ⁻	NG	35'	-	rot	174	233	200	175	209

Tabelle 6

Ergebnisse der Freisporanalyse von Rückkreuzungen TTC -
resistenter Mutanten von Schizosaccharomyces pombe mit dem
Wildtyp 975 h⁺

Mutante	TTC ^R	TTC ^S	wt	ade7	TTC ^R ade7	TTC ^S wt
BR 1	144 51	140 49	150 53	134 47 %	+	+
BR 2	242 47	274 53	250 48	266 52 %	+	+
Br 4	143 54	120 46	140 53	123 47 %	+	+
Br 6	115 49	120 51	110 47	125 53 %	+	+
Br 7	120 52	111 48	100 43	131 57 %	+	+
Br 8	133 46	156 54	130 45	159 55 %	+	+

+ bedeutet, dass diese Rekombinantenklassen vorhanden sind,
jedoch nicht zahlenmässig erfasst wurden.

Tabelle 7

Cobalt- Toleranz atmungsdefekter und atmungskompetenter Zellen
von Schizosaccharomyces pombe.

CoSO ₄ (mM)	Anzahl plattierter Zellen	Koloniezahl	Atmungsdefekte Kolonien
0,00	120	113	58
0,50	120	108	54
1,00	120	110	57
1,25	120	56	56
1,50	120	20	20
2,00	120	3	3
2,50	120	0	0
3,00	120	0	0

Es wurde ein Gemisch aus gleichen Teilen des Wildtyps 972 h⁺
und der karyotisch atmungsdefekten Mutante per 5 h⁺ ade7 plattiert.

Tabelle 8

Ergebnisse der Freisporanalyse von Rückkreuzungen cobaltresistenter Mutanten von Schizosaccharomyces pombe mit dem Wildtyp 975 h⁺

Mutante	Farbe auf Co-Medium	Co ^R	Co ^S	ade7	wt	Co ^R ade7	Co ^S wt
COB ^R ₁	braun	54 50	53 50	52 49	55 51 %	+	+
COB ^R ₂	braun	106 50	108 50	104 49	110 51 %	+	+
COB ^R ₃	braun	112 50	110 50	110 50	112 50 %	+	+
COW ^R ₁	weiss	83 49	85 51	85 51	83 49 %	+	+
COW ^R ₂	weiss	212 50	210 50	210 50	212 50 %	+	+
COW ^R ₃	weiss	166 50	168 50	160 48	174 52 %	+	+
COW ^R ₄	weiss	132 49	140 51	134 49	138 51 %	+	+

+ bedeutet, dass diese Rekombinantenklassen vorhanden sind, jedoch nicht zahlenmässig erfasst wurden.

Tabelle 9

Gruppierung der atmungsdefekten Mutanten von Schizosaccharomyces pombe nach benutzten Mutagenen und Anreicherungsverfahren.

Anreicherungsverfahren					
Induktion	ohne	TTC	Cobalt	Deoxyglucose	Mescinosit
Spontan	pet493	pet494-502	-	-	-
UV	pet162-186	pet 4-100 pet120-136 pet187-225	-	pet101-119	pet137-161
NG	pet226-282	pet401-429	pet356-400	-	-
ICR	-	pet430-444 pet503-509	-	-	-
MMS	-	pet533-540	-	-	-
DIÄ	-	pet510-532	-	-	-
^{32}P	-	pet446-492	-	-	-
AF	pet 1-3	-	-	-	-

Tabelle 10

Zusammenfassung der genetischen und biochemischen Daten der untersuchten atmungsdefekten Mutanten von Schizosaccharomyces pombe.

Abkürzungen :

Induktion: AF = Acriflavin
 UV = ultraviolette Licht
 NG = Nitrosoguanidin
 ICR = ICR 170
 ³²P = radioaktiver Phosphor
 DIÄ = Diäthylsulfat
 MMS = Methylmethansulfonat
 F = Induktion in Flüssigkeit
 P = Induktion auf Platte

Anreicherungsverfahren:

TTC = Triphenyl- Tetrazoliumchlorid
Co = Cobaltsulfat (Cobaltchlorid bei pet 445)
DG = Deoxyglucose
MI = Mesoinosit

Wachstum auf Glycerin:

- = kein Wachstum auf Glycerin nach 10 Tagen
1 = leaky: leichtes Wachstum auf Glycerin nach
10 Tagen

Genetische Analyse:

- = keine Analyse durchgeführt
R = Freisporanalyse (random spore)
T = Tetradenanalyse

Spektren:

- I = absolutes Tieftemperaturspektrum mit ganzen Zellen
- II = Differenzspektrum differentiell gereinigter Mitochondriensuspensionen bei Raumtemperatur von 400 - 650 nm
- III = Differenzspektrum submitochondrialer Partikel bei Raumtemperatur
- IV = Differenzspektrum differentiell gereinigter Mitochondriensuspensionen bei Raumtemperatur von 580 - 650 nm (Cytochrom a.₃ - Region)

Bemerkungen:

- Rev. - Test = Reversionstest
- TS = Test auf Temperatursensitivität
- OR = Test auf osmotische Heilbarkeit (osmotic remediability)

Alle Angaben sind Prozent der Enzymaktivitäten des zugehörigen Wildtypstammes.

Tabelle 10

Mutante, Laborbezeichn.	pet Nr.	Ausgangs- stamm	Induktion	Zeit	Anreicherungs- verfahren	Paarungstyp	Auxotrophie	Wachstum auf Glycerin	genetische Analyse
pet 1	pet 1	972h ⁻	AF/F	2d	-	h ⁻	wt	-	R
pet 2	pet 2	972h ⁻	AF/F	2d	-	h ⁻	wt	-	R
pet 3	pet 3	972h ⁻	AF/F	2d	-	h	wt	-	-
UV 1	pet 4	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 2	pet 5	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 3	pet 6	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 4	pet 7	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 5	pet 8	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 6	pet 9	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 7	pet 10	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 8	pet 11	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 9	pet 12	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 10	pet 13	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 11	pet 14	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 12	pet 15	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 13	pet 16	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 14	pet 17	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 15	pet 18	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 16	pet 19	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 17	pet 20	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 18	pet 21	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 19	pet 22	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 20	pet 23	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 21	pet 24	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 22	pet 25	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 23	pet 26	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 24	pet 27	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 25	pet 28	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 26	pet 29	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 27	pet 30	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 28	pet 31	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 29	pet 32	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 30	pet 33	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 31	pet 34	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 32	pet 35	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 33	pet 36	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 34	pet 37	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 35	pet 38	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R

pet Nr.	NADH-Cyt. c- Reduktase	Succ. -Cyt. c- Reduktase	Succ. - Cyt. c- Reduktase+PMS	CoQ-Cyt. c- Reduktase	NADH - Menadion- Reduktase	Succ. - Menadion- Reduktase	Cytochrom - oxidase	Spektrum	Bemerkungen
pet 1	-	-	-	-	-	-	2	I	von Bulder
pet 2	-	0	14	72	0	29	2	I	von Bulder
pet 3	-	43	65	85	29	100	2	I	von Bulder
pet 4	-	48	44	-	47	49	1		R. -Test:stabil
pet 5	-	86	63	-	-	-	1	II	R. -Test:stabil
pet 6	-	25	53	-	12	51	1		R. -Test:stabil
pet 7	-	53	83	-	-	-	1		
pet 8	-	246	-	-	-	-	96		
pet 9	-	119	89	-	-	-	38		
pet 10	-	71	67	-	0	2	1		
pet 11	-	0	28	-	16	26	0	II	
pet 12	-	1	12	0	8	37	27	III	
pet 13	-	51	50	-	-	-	3		
pet 14	-	175	109	-	-	-	162		
pet 15	-	175	115	-	-	-	55		
pet 16	-	133	104	-	15	39	88		
pet 17	-	65	66	-	-	-	66	II	
pet 18	-	104	110	-	-	-	180	II	
pet 19	-	0	5	2	13	26	22	I/III	R. -Test:stabil
pet 20	-	1	14	0	6	30	9	I/III	
pet 21	-	0	46	-	-	-	13		
pet 22	-	48	47	-	-	-	1		
pet 23	-	98	95	-	-	-	100		
pet 24	-	14	12	-	-	-	1		
pet 25	-	0	78	-	-	-	7		
pet 26	-	0	3	-	-	-	14		
pet 27	-	41	60	-	70	9	51		
pet 28	-	31	37	-	41	31	11		
pet 29	-	15	19	-	20	25	0		R. -Test:stabil
pet 30	-	77	113	-	81	176	45	II	
pet 31	-	0	2	9	2	2	0	I/III	
pet 32	-	14	22	-	23	13	45		
pet 33	-	0	3	1	4	2	0	III	
pet 34	-	44	47	-	-	-	93		
pet 35	-	117	102	-	-	-	34		
pet 36	-	67	68	-	-	-	0		
pet 37	-	202	111	-	-	-	51		
pet 38	-	82	49	-	-	-	4	II	

Mutante, Laborbezeichn.	pet Nr.	Ausgangs- stamm	Induktion	Zeit	Anreicherungs- verfahren	Paarungstyp	Auxotrophie	Wachstum auf Glycerin	genetische Analyse
UV 36	pet 39	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 37	pet 40	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 38	pet 41	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 39	pet 42	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 40	pet 43	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 41	pet 44	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 42	pet 45	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 43	pet 46	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-
UV 44	pet 47	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 45	pet 48	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 46	pet 49	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 47	pet 50	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 48	pet 51	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 49	pet 52	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 50	pet 53	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 51	pet 54	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 52	pet 55	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 53	pet 56	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 54	pet 57	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 55	pet 58	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 56	pet 59	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 57	pet 60	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	1	R
UV 58	pet 61	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	1	R
UV 59	pet 62	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 60	pet 63	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	R
UV 61	pet 64	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	1	-
UV 62	pet 65	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-
UV 64	pet 66	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-
UV 65	pet 67	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-
UV 66	pet 68	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-
UV 67	pet 69	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-
UV 69	pet 70	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-
UV 70	pet 71	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-
UV 71	pet 72	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-
UV 72	pet 73	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-
UV 75	pet 74	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-
UV 77	pet 75	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-
UV 78	pet 76	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-
UV 79	pet 77	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-
UV 80	pet 78	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-
UV 81	pet 79	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-
UV 85	pet 80	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-
UV 86	pet 81	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-
UV 91	pet 82	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-
UV 92	pet 83	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-
UV 97	pet 84	50h ⁻	UV/F	150''	TTC	h ⁻	ade7	-	-

pet Nr.	NADH-Cyt. c- Reduktase	Succ. -Cyt. c- Reduktase	Succ. -Cyt. c- Reduktase+PMS	CoQ-Cyt. c- Reduktase	NADH-Menadion- Reduktase	Succ. -Menadion- Reduktase	Cytochrom- oxidase	Spektrum	Bemerkungen
pet 39	-	15	54	75	41	53	42	I/III	
pet 40	-	83	94	-	-	-	54		
pet 41	-	81	68	-	-	-	0		
pet 42	-	36	43	-	-	-	0		
pet 43	-	175	105	-	-	-	29		
pet 44	-	181	165	-	-	-	113		
pet 45	-	8	27	-	-	-	19		
pet 46	-	175	127	-	-	-	67		
pet 47	-	42	39	-	-	-	0		
pet 48	-	84	79	-	-	-	24		
pet 49	-	94	81	-	-	-	67		
pet 50	-	29	29	-	-	-	0		
pet 51	-	158	124	-	-	-	76		
pet 52	-	106	96	-	-	-	71		
pet 53	-	47	44	-	-	-	0		
pet 54	-	19	42	-	-	-	0		
pet 55	-	117	111	-	-	-	25	II	
pet 56	-	65	77	-	-	-	33		
pet 57	-	42	63	-	-	-	0		
pet 58	-	36	46	-	-	-	0		
pet 59	-	44	59	-	-	-	0		
pet 60	-	78	67	-	-	-	5	II	
pet 61	-	75	63	-	-	-	27	II	
pet 62	-	9	91	-	-	-	3		
pet 63	-	14	38	-	-	-	0		
pet 64	-	93	69	-	-	-	155		
pet 65	-	75	68	-	-	-	0		
pet 66	-	56	76	-	-	-	0		
pet 67	-	44	84	-	-	-	0		
pet 68	-	26	37	-	-	-	0		
pet 69	-	0	6	1	2	22	0	II/IIIFlocken	
pet 70	-	63	53	-	-	-	0		
pet 71	-	4	26	31	22	34	24	I/II/III	
pet 72	-	0	14	-	-	-	0		
pet 73	-	81	85	-	-	-	28		
pet 74	-	33	24	-	-	-	0		
pet 75	-	94	72	-	-	-	12		
pet 76	-	0	51	-	-	-	4	II	
pet 77	-	36	24	-	-	-	2		
pet 78	-	438	265	-	-	-	40		
pet 79	-	8	30	-	-	-	1		
pet 80	-	42	52	-	-	-	1		
pet 81	-	3	18	-	-	-	17		
pet 82	-	15	21	-	-	-	19		
pet 83	-	78	54	-	-	-	46		
pet 84	-	26	67	-	-	-	63		

Mutante, Laborbezeichn.	pet Nr.	Ausgangs- stamm	Induktion	Zeit	Anreicherungs- verfahren	Paarungstyp	Auxotrophie	Wachstum auf Glycerin	genetische Analyse
UV 101	pet 85	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 103	pet 86	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	1	-
UV 104	pet 87	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	1	-
UV 105	pet 88	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 107	pet 89	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 109	pet 90	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 110	pet 91	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 111	pet 92	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 112	pet 93	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 113	pet 94	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 114	pet 95	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 115	pet 96	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 116	pet 97	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	R
UV 117	pet 98	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 118	pet 99	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 119	pet 100	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	R
UV 120	pet 101	50h	UV/F	150"	DG	h	ade7	-	-
UV 121	pet 102	50h	UV/F	150"	DG	h	ade7	-	-
UV 122	pet 103	50h	UV/F	150"	DG	h	ade7	-	-
UV 123	pet 104	50h	UV/F	150"	DG	h	ade7	-	-
UV 124	pet 105	50h	UV/F	150"	DG	h	ade7	-	-
UV 125	pet 106	50h	UV/F	150"	DG	h	ade7	-	-
UV 126	pet 107	50h	UV/F	150"	DG	h	ade7	-	-
UV 127	pet 108	50h	UV/F	150"	DG	h	ade7	-	-
UV 128	pet 109	50h	UV/F	150"	DG	h	ade7	-	-
UV 130	pet 110	50h	UV/F	150"	DG	h	ade7	-	-
UV 131	pet 111	50h	UV/F	150"	DG	h	ade7	-	-
UV 132	pet 112	50h	UV/F	150"	DG	h	ade7	-	-
UV 134	pet 113	50h	UV/F	150"	DG	h	ade7	-	-
UV 137	pet 114	50h	UV/F	150"	DG	h	ade7	-	-
UV 138	pet 115	50h	UV/F	150"	DG	h	ade7	-	-
UV 139	pet 116	50h	UV/F	150"	DG	h	ade7	-	-
UV 141	pet 117	50h	UV/F	150"	DG	h	ade7	-	-
UV 142	pet 118	50h	UV/F	150"	DG	h	ade7	-	-
UV 143	pet 119	50h	UV/F	150"	DG	h	ade7	-	-
UV 145	pet 120	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	1	-
UV 146	pet 121	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	1	-
UV 147	pet 122	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 148	pet 123	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 154	pet 124	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 155	pet 125	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 157	pet 126	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 162	pet 127	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 163	pet 128	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 169	pet 129	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 171	pet 130	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 172	pet 131	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-

pet Nr.	NADH-Cyt. c- Reduktase	Succ. -Cyt. c- Reduktase	Succ. -Cyt. c- Reduktase+PMS	CoQ-Cyt. c- Reduktase	NADH-Menadion- Reduktase	Succ. -Menadion- Reduktase	Cytochrom - oxidase Spektrum
pet 85	-	32	26	-	-	-	15
pet 86	-	169	141	-	-	-	167
pet 87	-	139	92	-	-	-	92
pet 88	-	28	69	-	10	54	25
pet 89	-	0	8	-	4	8	2
pet 90	-	0	37	-	29	20	15
pet 91	-	80	55	-	-	-	62 I
pet 92	-	39	42	-	0	7	6
pet 93	-	46	58	-	-	-	12
pet 94	-	75	65	-	-	-	58
pet 95	-	39	51	-	10	41	4 II
pet 96	-	69	81	-	-	-	18
pet 97	-	25	29	-	-	-	0 II
pet 98	-	25	39	-	-	-	0 II
pet 99	-	25	41	-	-	-	0 II
pet 100	-	8	47	25	69	57	37 III
pet 101	-	31	35	-	36	24	0 II
pet 102	-	58	57	-	21	14	13
pet 103	-	67	61	-	-	-	20
pet 104	-	0	20	-	6	31	11
pet 105	-	14	34	-	19	31	0
pet 106	-	22	37	-	3	2	0 II
pet 107	-	142	102	-	27	106	128
pet 108	-	136	104	-	-	-	77
pet 109	-	0	19	-	15	14	23
pet 110	-	25	58	-	36	66	99
pet 111	-	78	113	-	136	117	136
pet 112	-	0	0	-	0	7	0
pet 113	-	100	111	-	50	95	78
pet 114	-	57	88	-	129	228	260
pet 115	-	27	66	-	16	66	52
pet 116	-	92	67	-	-	-	114
pet 117	-	0	20	-	22	28	3
pet 118	-	49	48	-	14	20	16
pet 119	-	16	124	-	81	78	98
pet 120	-	21	132	-	20	129	9
pet 121	-	177	119	-	-	-	77
pet 122	-	17	36	-	-	-	1
pet 123	-	10	62	40	90	44	86
pet 124	-	55	40	-	-	-	59
pet 125	-	21	22	-	-	-	3
pet 126	-	0	5	-	26	26	2
pet 127	-	70	85	-	-	-	10
pet 128	-	44	37	-	-	-	1
pet 129	-	0	9	-	-	-	0 II
pet 130	-	55	63	-	-	-	37
pet 131	-	49	110	-	37	102	65

Mutante, Laborbezeichn.	pet Nr.	Ausgangs- stamm	Induktion	Zeit	Anreicherungs- verfahren	Paarungstyp	Auxotrophie	Wachstum auf Glycerin	genetische Analyse
UV 173	pet 132	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 174	pet 133	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	1	-
UV 175	pet 134	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 176	pet 135	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 180	pet 136	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 181	pet 137	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 183	pet 138	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 184	pet 139	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 185	pet 140	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 186	pet 141	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 187	pet 142	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 188	pet 143	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 189	pet 144	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 190	pet 145	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 191	pet 146	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 193	pet 147	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 196	pet 148	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 197	pet 149	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 198	pet 150	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 199	pet 151	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 202	pet 152	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 203	pet 153	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 206	pet 154	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 207	pet 155	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 208	pet 156	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 209	pet 157	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 210	pet 158	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 211	pet 159	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 212	pet 160	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 213	pet 161	50h	UV/F	150"	MI	h	ade7	-	-
UV 214	pet 162	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	1	-
UV 218	pet 163	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	-	-
UV 228	pet 164	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	-	-
UV 229	pet 165	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	1	-
UV 230	pet 166	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	1	-
UV 231	pet 167	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	1	-
UV 233	pet 168	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	-	-
UV 234	pet 169	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	1	-
UV 237	pet 170	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	1	-
UV 238	pet 171	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	1	-
UV 239	pet 172	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	1	-
UV 240	pet 173	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	1	-
UV 241	pet 174	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	1	-
UV 242	pet 175	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	1	-
UV 243	pet 176	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	-	-
UV 244	pet 177	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	1	-

pet Nr.	NADH-Cyt, c- Reduktase	Succ. -Cyt, c- Reduktase	Succ. -Cyt, c- Reduktase+PMS	CoQ-Cyt, c- Reduktase	NADH - Menadion- Reduktase	Succ. -Menadion- Reduktase	Cytochrom- oxidase	Spektrum	Bemerkungen
pet 132	-	0	6	-	18	4	4		
pet 133	-	42	44	-	55	129	65		
pet 134	-	21	19	-	-	-	2		
pet 135	-	0	133	-	26	80	131		
pet 136	-	0	8	-	11	16	-		
pet 137	-	0	9	-	-	-	2		
pet 138	-	12	70	-	97	33	43		
pet 139	-	42	93	-	30	98	84		
pet 140	-	0	18	-	18	15	4		
pet 141	-	154	174	-	151	196	71		
pet 142	-	0	44	-	8	31	45		
pet 143	-	0	29	-	6	25	16		
pet 144	-	0	36	-	11	83	10		
pet 145	-	0	50	-	12	35	63		
pet 146	-	0	26	-	22	15	-		
pet 147	-	40	31	-	-	-	1		
pet 148	-	11	31	-	21	57	1		
pet 149	-	0	9	-	8	9	0		
pet 150	-	-	-	-	62	79	-		
pet 151	-	51	39	-	-	-	22		
pet 152	-	5	89	-	27	62	189		
pet 153	-	28	33	2	10	64	0	I/III	
pet 154	-	28	89	-	29	66	71		
pet 155	-	19	92	-	18	53	72		
pet 156	-	0	0	-	-	-	5		
pet 157	-	47	53	-	40	74	48		
pet 158	-	0	9	-	12	27	10		
pet 159	-	56	47	-	-	-	67		
pet 160	-	170	105	-	-	-	33		
pet 161	-	19	35	24	62	67	23	I/III	
pet 162	-	44	36	-	-	-	110		
pet 163	-	0	17	-	12	9	4		
pet 164	-	102	99	-	111	120	143		
pet 165	-	14	10	-	8	10	24		
pet 166	-	0	58	-	25	45	31		
pet 167	-	0	6	-	8	21	4		
pet 168	-	126	105	-	-	-	147		
pet 169	-	0	160	-	89	121	379		
pet 170	-	116	114	-	72	115	118		
pet 171	-	0	141	-	112	114	65		
pet 172	-	6	12	-	-	-	6	IV	TS/OR
pet 173	-	26	18	-	-	-	23		
pet 174	-	97	112	-	-	-	61		
pet 175	-	22	41	-	-	-	19		
pet 176	-	0	38	-	0	33	1		
pet 177	-	61	79	-	-	-	67		

Mutante, Laborbezeichn.	pet Nr.	Ausgangs- stamm	Induktion	Zeit	Anreicherungs- verfahren	Paarungstyp	Auxotrophie	Wachstum auf Glycerin	genetische Analyse
UV 245	pet 178	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	-	-
UV 246	pet 179	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	-	-
UV 247	pet 180	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	-	-
UV 248	pet 181	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	-	-
UV 249	pet 182	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	-	-
UV 250	pet 183	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	-	-
UV 251	pet 184	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	-	-
UV 252	pet 185	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	-	-
UV 253	pet 186	50h	UV/F	150"	-	h	ade7	-	-
UV 254	pet 187	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 255	pet 188	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 257	pet 189	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 258	pet 190	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 259	pet 191	50h	UV/F	150"	ITC	h	ade7	-	-
UV 260	pet 192	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 261	pet 193	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 262	pet 194	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 263	pet 195	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 264	pet 196	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 266	pet 197	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 267	pet 198	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 269	pet 199	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 270	pet 200	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 271	pet 201	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 272	pet 202	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 273	pet 203	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	1	-
UV 274	pet 204	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 275	pet 205	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 276	pet 206	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 277	pet 207	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	1	-
UV 278	pet 208	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	1	-
UV 279	pet 209	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	1	-
UV 280	pet 210	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 281	pet 211	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	1	-
UV 282	pet 212	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 283	pet 213	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 284	pet 214	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 285	pet 215	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 286	pet 216	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	1	-
UV 287	pet 217	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 288	pet 218	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 289	pet 219	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 290	pet 220	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 292	pet 221	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 296	pet 222	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 298	pet 223	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 299	pet 224	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	-	-
UV 302	pet 225	50h	UV/F	150"	TTC	h	ade7	1	-

pet Nr.	NADH-Cyt. c- Reduktase	Succ.-Cyt. c- Reduktase	Succ. -Cyt. c- Reduktase+PMS	CoQ-Cyt. c- Reduktase	NADH-Menadion- Reduktase	Succ. -Menadion- Reduktase	Cytochrom- oxidase	Spektrum	Bemerkungen
pet 178	-	0	37	-	-	-	26		
pet 179	-	4	8	-	36	62	1	IV	R. -Test:stabil, TS/OR
pet 180	-	17	14	-	-	-	16	IV	
pet 181	-	0	6	-	-	-	0		
pet 182	-	10	40	-	-	-	84		TS/OR
pet 183	-	0	39	-	17	43	0		TS/OR
pet 184	-	3	3	-	-	-	3		TS/OR
pet 185	-	14	7	-	-	-	0	IV	TS/OR
pet 186	-	0	5	-	-	-	0	IV	
pet 187	-	0	3	-	0	32	0		R. -Test:stabil, TS/OR
pet 188	-	0	89	-	66	76	0		
pet 189	-	0	7	-	-	-	0		TS/OR
pet 190	-	1	18	-	-	-	5		TS/OR
pet 191	-	82	107	-	86	67	46		TS/OR
pet 192	-	0	6	-	-	-	2	IV	TS/OR
pet 193	-	14	11	-	-	-	0	II	TS/OR
pet 194	-	0	18	-	-	-	1		
pet 195	-	0	24	-	-	-	0	II	TS/OR
pet 196	-	0	18	-	18	25	0	IV	TS/OR
pet 197	-	14	15	-	0	23	0		TS/OR
pet 198	-	0	11	-	-	-	0	IV	TS/OR
pet 199	-	43	80	-	-	-	17		
pet 200	-	6	7	-	-	-	1	II	TS/OR
pet 201	-	22	22	-	-	-	88		TS/OR
pet 202	-	0	86	-	-	-	31		TS/OR
pet 203	-	51	35	-	-	-	50		TS/OR
pet 204	-	4	34	-	-	-	0		TS/OR
pet 205	-	4	15	-	-	-	6		TS/OR
pet 206	-	14	18	-	-	-	19		TS/OR
pet 207	-	0	47	-	-	-	22		
pet 208	-	21	141	-	-	-	31		TS/OR
pet 209	-	21	22	-	-	-	54		TS/OR
pet 210	-	6	9	-	-	-	4	IV	TS/OR
pet 211	-	10	61	-	-	-	25		TS/OR
pet 212	-	3	3	-	-	-	0		TS/OR
pet 213	-	0	37	-	-	-	6		TS/OR
pet 214	-	131	85	-	-	-	20		
pet 215	-	13	1	-	-	-	0		TS/OR
pet 216	-	2	23	-	-	-	2	IV	TS/OR
pet 217	-	0	14	-	19	33	1		TS/OR
pet 218	-	0	8	-	-	-	0	IV	TS/OR
pet 219	-	0	52	-	31	115	2		TS/OR
pet 220	-	0	255	-	-	-	103		TS/OR
pet 221	-	18	33	-	24	38	0		
pet 222	-	0	21	-	-	-	0		
pet 223	-	44	39	-	-	-	42		
pet 224	-	3	10	-	-	-	1		
pet 225	-	51	70	-	71	63	63		

Mutante, Laborbezeichn.	pet Nr.	Ausgangs- stamm	Induktion	Zeit	Anreicherungs- verfahren	Paarungstyp	Auxotrophie	Wachstum auf Glycerin	genetische Analyse
NG 2	pet 226	50h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	ade7	-	T
NG 4	pet 227	50h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	ade7	-	T
NG 6	pet 228	50h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	wt	-	T
NG 7	pet 229	50h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	ade7	-	T
NG 8	pet 230	50h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	wt	-	T
NG 12	pet 231	50h ⁻	NG/F	15'	-	h ⁻	wt	-	-
NG 14	pet 232	50h ⁻	NG/F	60'	-	h ⁻	wt	-	T
NG 18	pet 233	972h ⁻	NG/F	60'	-	h ⁻	wt	-	T
NG 29	pet 234	972h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	wt	-	-
NG 30	pet 235	972h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	wt	-	-
NG 31	pet 236	972h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	wt	-	-
NG 32	pet 237	972h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	wt	-	-
NG 33	pet 238	972h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	wt	-	-
NG 34	pet 239	972h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	wt	-	-
NG 35	pet 240	972h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	wt	-	-
NG 37	pet 241	972h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	wt	-	T
NG 38	pet 242	972h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	wt	-	T
NG 39	pet 243	972h ⁻	NG/F	60'	-	h ⁻	wt	-	T
NG 57	pet 244	50h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	ade7	-	T
NG 58	pet 245	88h ⁺	NG/F	30'	-	h ⁺	his2	-	T
NG 59	pet 246	88h ⁺	NG/F	30'	-	h ⁺	his2	-	R
NG 60	pet 247	88h ⁺	NG/F	30'	-	h ⁺	his2	-	TR
NG 61	pet 248	88h ⁺	NG/F	30'	-	h ⁺	his2	-	R
NG 62	pet 249	88h ⁺	NG/F	30'	-	h ⁺	his2	-	R
NG 64	pet 250	88h ⁺	NG/F	30'	-	h ⁺	his2	-	R
NG 65	pet 251	88h ⁺	NG/F	30'	-	h ⁺	his2	-	-
NG 66	pet 252	88h ⁺	NG/F	30'	-	h ⁺	his2	-	R
NG 67	pet 253	88h ⁺	NG/F	30'	-	h ⁺	his2	-	-
NG 68	pet 254	88h ⁺	NG/F	30'	-	h ⁺	his2	-	R
NG 71	pet 255	88h ⁺	NG/F	30'	-	h ⁺	his2	-	R
NG 72	pet 256	88h ⁺	NG/F	30'	-	h ⁺	his2	-	R
NG 73	pet 257	88h ⁺	NG/F	30'	-	h ⁺	his2	-	R
NG 74	pet 258	88h ⁺	NG/F	30'	-	h ⁺	his2	-	R
NG 75	pet 259	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 76	pet 260	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 77	pet 261	50h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 78	pet 262	50h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	ade7	-	-
NG 79	pet 263	50h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 80	pet 264	50h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 81	pet 265	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 83	pet 266	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 84	pet 267	50h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	ade7	-	-
NG 85	pet 268	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 86	pet 269	50h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 89	pet 270	50h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 90	pet 271	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 92	pet 272	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	-

pet Nr.	NADH-Cyt. c- Reduktase	Succ. -Cyt. c- Reduktase	Succ. -Cyt. c- Reduktase+FMS	CoQ-Cyt. c- Reduktase	NADH - Menadion- Reduktase	Succ. - Menadion- Reduktase	Cytochrom- oxidase Spektrum	Bemerkungen
pet 226	-	0	54	-	-	-	0	TS/OR
pet 227	-	72	156	-	-	-	9 II	TS/OR
pet 228	-	88	146	-	-	-	25 II	
pet 229	-	104	177	-	-	-	73 II	
pet 230	-	132	219	-	-	-	28	
pet 231	-	74	156	-	-	-	31 IV	TS/OR
pet 232	-	37	92	-	-	-	15 II	TS/OR
pet 233	-	117	152	-	-	-	81	TS/OR
pet 234	-	44	68	-	-	-	90 IV	TS/OR
pet 235	-	142	176	-	-	-	63	revertiert stark, TS/OR
pet 236	-	153	175	-	-	-	94	revertiert stark, TS/OR
pet 237	-	53	110	-	-	-	32	revertiert stark, TS/OR
pet 238	-	49	74	-	-	-	26	
pet 239	-	0	47	-	-	-	0	TS/OR
pet 240	-	54	62	-	-	-	44	
pet 241	-	0	98	-	-	-	8	TS/OR
pet 242	-	38	69	-	-	-	23	TS/OR
pet 243	-	-	-	-	-	-	-	
pet 244	-	134	109	-	-	-	129 II	TS/OR
pet 245	-	38	46	-	-	-	26 II	TS/OR
pet 246	-	0	46	-	-	-	31	TS/OR
pet 247	-	78	88	-	-	-	28	TS/OR
pet 248	-	256	134	-	-	-	156	TS/OR
pet 249	-	60	72	-	-	-	50	TS/OR
pet 250	-	-	-	-	-	-	-	
pet 251	-	33	35	-	-	-	35	TS/OR
pet 252	-	0	-	-	-	-	0	
pet 253	-	42	41	-	-	-	69	
pet 254	-	32	107	-	-	-	11 II	
pet 255	-	-	-	-	-	-	0	
pet 256	-	19	87	-	-	-	92 IV	
pet 257	-	24	106	-	7	37	0	R. -Test:stabil, TS/OR
pet 258	-	5	41	-	-	-	0 IV	TS/OR
pet 259	-	0	21	-	-	-	0	TS/OR
pet 260	-	4	25	-	0	37	0 IV	R. -Test:stabil, TS/OR
pet 261	-	103	141	-	-	-	70 II/IV	revertiert stark, TS/OR
pet 262	-	40	97	-	-	-	60 IV	TS/OR
pet 263	-	29	69	-	-	-	35 IV	TS/OR
pet 264	-	23	48	-	-	-	17 IV	TS/OR
pet 265	-	0	35	-	-	-	1 II/IV	TS/OR
pet 266	-	23	52	-	-	-	0 II	
pet 267	-	11	380	-	-	-	378 II/IV	TS/OR
pet 268	-	36	54	-	-	-	19 II/IV	
pet 269	-	7	282	-	-	-	91 II/IV	TS/OR
pet 270	-	-	-	-	-	-	-	revertiert stark, TS/OR
pet 271	-	17	57	-	-	-	20 IV	
pet 272	-	2	19	-	-	-	0	

Mutante, Laborbezeichn.	pet Nr.	Ausgangs- stamm	Induktion	Zeit	Anreicherungs- verfahren	Paarungstyp	Auxotrophie	Wachstum auf Glycerin	genetische Analyse
NG 93	pet 273	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 94	pet 274	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	-
NG 95	pet 275	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 96	pet 276	50h ⁻	NG/F	15'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 97	pet 277	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 98	pet 278	50h ⁻	NG/F	15'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 99	pet 279	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 100	pet 280	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 101	pet 281	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 102	pet 282	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 103	pet 283	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 106	pet 284	50h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	ade7	-	-
NG 111	pet 285	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 112	pet 286	50h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	ade7	-	T
NG 114	pet 287	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	T
NG 115	pet 288	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 116	pet 289	50h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 121	pet 290	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 122	pet 291	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 123	pet 292	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	-
NG 129	pet 293	50h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 130	pet 294	50h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 131	pet 295	50h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	ade7	-	-
NG 132	pet 296	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 133	pet 297	88h ⁺	NG/F	30'	-	h ⁺	his2	-	R
NG 134	pet 298	88h ⁺	NG/F	30'	-	h ⁺	his2	-	R
NG 136	pet 299	50h ⁻	NG/F	15'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 137	pet 300	50h ⁻	NG/F	15'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 138	pet 301	50h ⁻	NG/F	15'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 139	pet 302	88h ⁺	NG/F	15'	-	h ⁺	his2	-	R
NG 140	pet 303	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 141	pet 304	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 142	pet 305	50h ⁻	NG/F	15'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 143	pet 306	50h ⁻	NG/F	15'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 144	pet 307	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 145	pet 308	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 146	pet 309	50h ⁻	NG/F	30'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 147	pet 310	50h ⁻	NG/F	15'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 148	pet 311	50h ⁻	NG/F	15'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 150	pet 312	50h ⁻	NG/F	15'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 151	pet 313	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 152	pet 314	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 154	pet 315	50h ⁻	NG/F	15'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 155	pet 316	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 156	pet 317	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 157	pet 318	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R
NG 158	pet 319	50h ⁻	NG/F	45'	-	h ⁻	ade7	-	R

pet Nr.	NADH-Cyt. c - Reduktase	Succ. -Cyt. c - Reduktase	Succ. -Cyt. c - Reduktase+PMS	CoQ-Cyt. c - Reduktase	NADH-Menadion - Reduktase	Succ. -Menadion - Reduktase	Cytochrom - oxidase	Spektrum	Bemerkungen
pet 273	-	161	233	-	-	-	96	IV	
pet 274	-	0	27	-	-	-	25		TS/OR
pet 275	-	4	26	-	-	-	0		TS/OR
pet 276	-	-	-	-	-	-	0		
pet 277	-	-	-	-	-	-	0		
pet 278	-	-	-	-	-	-	0	IV	
pet 279	-	6	25	-	-	-	4		TS/OR
pet 280	-	-	-	-	-	-	0		
pet 281	-	-	-	-	-	-	0		
pet 282	-	56	63	-	82	50	25		
pet 283	-	-	-	-	-	-	0		
pet 284	-	38	55	-	19	67	-		
pet 285	-	0	10	-	4	16	4		
pet 286	-	-	-	-	-	-	0		
pet 287	-	0	8	-	-	10	2		
pet 288	-	-	-	-	-	-	-		
pet 289	-	-	-	-	-	-	0		
pet 290	-	-	-	-	-	-	-		
pet 291	-	-	-	-	-	-	-		
pet 292	-	24	111	-	-	-	19		TS/OR
pet 293	-	0	51	-	10	20	0		
pet 294	-	-	-	-	-	-	0		
pet 295	-	0	20	-	11	45	0		
pet 296	-	-	-	-	-	-	0		
pet 297	-	-	-	-	-	-	0		
pet 298	-	0	5	-	6	0	0		
pet 299	-	-	-	-	-	-	-		
pet 300	-	-	-	-	-	-	0		
pet 301	-	-	-	-	-	-	-		
pet 302	-	-	-	-	-	-	0		
pet 303	-	-	-	-	-	-	0		
pet 304	-	-	-	-	-	-	0		
pet 305	-	0	5	-	39	15	5		
pet 306	-	-	-	-	-	-	0		
pet 307	-	17	-	-	30	34	4		
pet 308	-	-	-	-	-	-	0		
pet 309	-	-	-	-	-	-	0		
pet 310	-	96	136	-	77	159	84		
pet 311	-	-	-	-	-	-	0		
pet 312	-	-	-	-	-	-	0		
pet 313	-	-	-	-	-	-	0		
pet 314	-	-	-	-	-	-	0		
pet 315	-	-	-	-	-	-	0		
pet 316	-	-	-	-	-	-	0		
pet 317	-	165	130	-	73	143	120		
pet 318	-	0	18	-	7	22	0		
pet 319	-	8	36	-	39	37	14		

Mutante, Laborbezeichn.	pet Nr.	Ausgangs- stamm	Induktion	Zeit	Anreicherungs- verfahren Paarungstyp Auxotrophie	Wachstum auf Glycerin	genetische Analyse
NG 159	pet 320	50h ⁻	NG/F	15'	- h ⁻ ade7	-	R
NG 161	pet 321	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 162	pet 322	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 163	pet 323	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 164	pet 324	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 165	pet 325	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 166	pet 326	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 167	pet 327	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 168	pet 328	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 169	pet 329	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 172	pet 330	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 173	pet 331	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 174	pet 332	88h ⁺	NG/F	30'	- h ⁺ his 2	-	R
NG 175	pet 333	88h ⁺	NG/F	30'	- h ⁺ his 2	-	R
NG 176	pet 334	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 177	pet 335	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 178	pet 336	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 179	pet 337	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 182	pet 338	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 183	pet 339	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 184	pet 340	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 185	pet 341	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 186	pet 342	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 187	pet 343	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 188	pet 344	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 190	pet 345	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 191	pet 346	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 192	pet 347	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 193	pet 348	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	R
NG 194	pet 349	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 195	pet 350	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 197	pet 351	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 198	pet 352	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 199	pet 353	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 200	pet 354	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-
NG 282	pet 355	50h ⁻	NG/F	30'	- h ⁻ ade7	-	-

CoRD2-1	pet 356	972h ⁻	NG/F	35'	2mM h ⁻ wt	1	-	§
CoRD2-3	pet 357	972h ⁻	NG/F	35'	2mM h ⁻ wt	-	-	-
CoRD2-6	pet 358	972h ⁻	NG/F	35'	2mM h ⁻ wt	-	-	-
CoRD2-9	pet 359	972h ⁻	NG/F	35'	2mM h ⁻ wt	-	-	-
CoRD2-10	pet 360	972h ⁻	NG/F	35'	2mM h ⁻ wt	1	-	-
CoRD2-11	pet 361	972h ⁻	NG/F	35'	2mM h ⁻ wt	1	-	-
CoRD2-13	pet 362	972h ⁻	NG/F	35'	2mM h ⁻ wt	-	-	-
CoRD2-16	pet 363	972h ⁻	NG/F	35'	2mM h ⁻ wt	-	-	-
CoRD2-19	pet 364	972h ⁻	NG/F	35'	2mM h ⁻ wt	-	-	-

§ Cobaltkonzentration in mM

pet Nr.	NADH-Cyt. c- Reduktase	Succ. -Cyt. c- Reduktase	Succ. -Cyt. c- Reduktase+PMS	CoQ-Cyt. c- Reduktase	NADH-Menadion- Reduktase	Succ. -Menadion- Reduktase	Cytochrom- oxidase	Spektrum	Bemerkungen
pet 320	-	-	-	-	-	-	0		
pet 321	-	8	17	-	27	18	0		
pet 322	-	29	51	-	56	45	12		
pet 323	-	0	14	-	19	51	0		
pet 324	-	24	50	-	49	47	23		
pet 325	-	6	57	-	-	-	13	IV	TS/OR
pet 326	-	3	69	-	74	46	11	IV	
pet 327	-	8	118	-	-	-	7		TS/OR
pet 328	-	41	116	-	-	-	36		revertiert stark, TS/OR
pet 329	-	6	103	-	-	-	0	IV	
pet 330	-	24	42	-	-	-	11	IV	
pet 331	-	15	73	-	-	-	26		revertiert stark, TS/OR
pet 332	-	0	93	-	-	-	10		TS/OR
pet 333	-	5	39	-	-	-	2		TS/OR
pet 334	-	0	10	-	22	36	2		R. -Test:stabil, TS/OR
pet 335	-	106	163	-	14	80	117		revertiert stark, TS/OR
pet 336	-	3	44	-	-	-	1		
pet 337	-	9	118	-	-	-	0		
pet 338	-	123	190	-	199	218	135		revertiert stark, TS/OR
pet 339	-	1	19	-	-	-	4		TS/OR
pet 340	-	0	44	-	-	-	11	IV	TS/OR
pet 341	-	0	9	-	-	-	4		TS/OR
pet 342	-	19	27	-	-	-	0		revertiert stark, TS/OR
pet 343	-	72	72	-	-	-	74	II/IV	TS/OR
pet 344	-	0	39	-	16	36	1		revertiert stark, TS/OR
pet 345	-	40	107	-	-	-	66		TS/OR
pet 346	-	25	47	-	54	47	13		TS/OR
pet 347	-	19	56	-	-	-	44		revertiert stark, TS/OR
pet 348	-	0	99	-	-	-	2		TS/OR
pet 349	-	15	24	-	31	25	10	IV	TS/OR
pet 350	-	3	25	-	-	-	2		TS/OR
pet 351	-	10	25	-	-	-	0		TS/OR
pet 352	-	58	61	-	-	-	42	IV	revertiert stark, TS/OR
pet 353	-	56	56	-	-	-	8	IV	TS/OR
pet 354	-	6	16	-	-	-	1		TS/OR
pet 355	-	-	-	-	-	-	-		

pet 356	-	5	30	-	-	-	3	
pet 357	-	3	45	-	-	-	17	
pet 358	-	12	32	-	-	-	13	
pet 359	-	18	29	-	-	-	35	
pet 360	-	27	30	-	-	-	25	
pet 361	-	35	36	-	-	-	30	
pet 362	-	20	31	-	-	-	2	
pet 363	-	3	21	-	-	-	1	
pet 364	-	7	9	-	-	-	8	

Mutante, Laborbezeichn.	pet Nr.	Ausgangs- stamm	Induktion	Zeit	Anreicherungs- verfahren	Paarungstyp	Auxotrophie	Wachstum auf Glycerin	genetische Analyse
CoRD2-22	pet 365	972h ⁻	NG/F	35'	2mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD2-23	pet 366	972h ⁻	NG/F	35'	2mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD2-24	pet 367	972h ⁻	NG/F	35'	2mM	h ⁻	wt	1	-
CoRD2-25	pet 368	972h ⁻	NG/F	35'	2mM	h ⁻	wt	1	-

CoRD1, 5-1	pet 369	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD1, 5-2	pet 370	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD1, 5-3	pet 371	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD1, 5-4	pet 372	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	R
CoRD1, 5-5	pet 373	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD1, 5-6	pet 374	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	R
CoRD1, 5-7	pet 375	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD1, 5-8	pet 376	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	R
CoRD1, 5-9	pet 377	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD1, 5-11	pet 378	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	1	-
CoRD1, 5-12	pet 379	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	1	-
CoRD1, 5-13	pet 380	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD1, 5-14	pet 381	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD1, 5-16	pet 382	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD1, 5-17	pet 383	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	1	-
CoRD1, 5-18	pet 384	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	1	-
CoRD1, 5-20	pet 385	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD1, 5-21	pet 386	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	R
CoRD1, 5-22	pet 387	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	R
CoRD1, 5-24	pet 388	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD1, 5-26	pet 389	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD1, 5-27	pet 390	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD1, 5-28	pet 391	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD1, 5-29	pet 392	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	R
CoRD1, 5-30	pet 393	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD1, 5-31	pet 394	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD1, 5-32	pet 395	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD1, 5-33	pet 396	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD1, 5-34	pet 397	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD1, 5-35	pet 398	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	-
CoRD1, 5-36	pet 399	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	R
CoRD1, 5-37	pet 400	972h ⁻	NG/F	35'	1,5mM	h ⁻	wt	-	R

b 1	pet 401	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	-
b 2	pet 402	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	-
b 3	pet 403	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	-

pet Nr.	NADH-Cyt. c- Reduktase	Succ. -Cyt. c- Reduktase	Succ. -Cyt. c- Reduktase+PMS	CoQ-Cyt. c- Reduktase	NADH-Menadion- Reduktase	Succ. -Menadion- Reduktase	Cytochrom- oxidase	Bemerkungen
pet 365	-	2	27	-	-	-	20	
pet 366	-	2	38	-	-	-	21	
pet 367	-	11	44	-	-	-	30	
pet 368	-	8	40	-	-	-	12	

pet 369	-	3	5	-	9	6	0	
pet 370	-	50	49	-	132	47	74	
pet 371	-	0	18	-	0	14	0	
pet 372	-	0	11	-	16	36	0	
pet 373	-	0	24	-	12	21	21	
pet 374	-	0	54	-	25	41	6	
pet 375	-	0	17	-	10	17	0	
pet 376	-	0	19	-	10	14	10	
pet 377	-	0	19	-	23	19	28	
pet 378	-	0	11	-	13	19	0	
pet 379	-	0	12	-	6	14	2	
pet 380	-	0	64	-	19	68	111	
pet 381	-	-	8	-	4	27	9	
pet 382	-	0	-	-	21	79	-	
pet 383	-	0	8	-	8	6	1	
pet 384	-	0	8	-	6	11	0	
pet 385	-	0	93	-	31	35	12	
pet 386	-	0	22	-	12	27	2	
pet 387	-	0	46	-	8	45	2	
pet 388	-	0	45	-	7	46	6	
pet 389	-	77	84	-	29	93	109	
pet 390	-	0	4	-	0	0	0	
pet 391	-	0	43	41	39	32	38	
pet 392	-	12	53	-	17	43	38	
pet 393	-	0	29	-	8	30	0	
pet 394	-	0	154	-	164	77	189	
pet 395	-	6	23	-	52	25	24	
pet 396	-	2	48	-	43	38	46	
pet 397	-	0	21	-	70	24	18	
pet 398	-	0	8	-	8	26	2	
pet 399	-	0	35	-	28	20	3	
pet 400	-	17	24	-	35	26	14	

pet 401	-	0	9	-	6	6	0	auf TTC-Medium weiß
pet 402	-	0	8	-	8	3	0	auf TTC-Medium weiß
pet 403	-	0	11	-	7	8	0	auf TTC-Medium weiß

Mutante, Laborbezeichn.	pet Nr.	Ausgangs- stamm	Induktion	Zeit	Anreicherungs- verfahren	Paarungstyp	Auxotrophie	Wachstum auf Glycerin	genetische Analyse
br 5	pet 404	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	-
b 7	pet 405	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	-
b 8	pet 406	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	R
b 10	pet 407	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	R
b 11	pet 408	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	R
b 12	pet 409	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	R
b 13	pet 410	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	-
br 15	pet 411	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	-
br 16	pet 412	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	-
br 18	pet 413	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	-
b 21	pet 414	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	R
br 24	pet 415	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	R
b 25	pet 416	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	R
b 26	pet 417	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	R
br 29	pet 418	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	R
b 29	pet 419	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	R
br 30	pet 420	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	R
bR 31	pet 421	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	-
bR 32	pet 422	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	-
br 33	pet 423	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	-
br 34	pet 424	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	-
b 36	pet 425	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	R
br 37	pet 426	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	R
br 38	pet 427	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	1	R
b 39	pet 428	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	R
b 42	pet 429	972h ⁻	NG/F	35'	TTC	h ⁻	wt	-	R

ICR 1	pet 430	972h ⁻	ICR/F	3h	TTC	h ⁻	wt	-	-
ICR 2	pet 431	972h ⁻	ICR/F	3h	TTC	h ⁻	wt	-	-
ICR 3	pet 432	972h ⁻	ICR/F	3h	TTC	h ⁻	wt	-	-
ICR 4	pet 433	972h ⁻	ICR/F	3h	TTC	h ⁻	wt	-	-
ICR 5	pet 434	972h ⁻	ICR/F	3h	TTC	h ⁻	wt	-	-
ICR 6	pet 435	972h ⁻	ICR/F	3h	TTC	h ⁻	wt	-	-
ICR 7	pet 436	972h ⁻	ICR/F	3h	TTC	h ⁻	wt	-	-
ICR 8	pet 437	972h ⁻	ICR/F	3h	TTC	h ⁻	wt	-	-
ICR 9	pet 438	972h ⁻	ICR/F	3h	TTC	h ⁻	wt	-	-
ICR 10	pet 439	972h ⁻	ICR/F	3h	TTC	h ⁻	wt	-	-
ICR 11	pet 440	972h ⁻	ICR/F	3h	TTC	h ⁻	wt	-	-
ICR 12	pet 441	972h ⁻	ICR/F	3h	TTC	h ⁻	wt	-	-
ICR 13	pet 442	972h ⁻	ICR/F	3h	TTC	h ⁻	wt	-	-
ICR 14	pet 443	972h ⁻	ICR/F	3h	TTC	h ⁻	wt	-	-
ICR 15	pet 444	972h ⁻	ICR/F	3h	TTC	h ⁻	wt	-	-

pet Nr.	NADH-Cyt. c- Reduktase	Succ. -Cyt. c- Reduktase	Succ. -Cyt. c- Reduktase+PMS	CoQ-Cyt. c- Reduktase	NADH-Menadion- Reduktase	Succ. -Menadion- Reduktase	Cytochrom- oxidase	Bemerkungen
pet 404	-	0	42	-	6	41	4	auf TTC-Medium hellrot
pet 405	-	0	34	-	10	44	11	auf TTC-Medium weiß
pet 406	-	0	16	-	14	21	22	auf TTC-Medium weiß
pet 407	-	7	31	-	10	36	0	auf TTC-Medium weiß
pet 408	-	62	63	-	25	67	28	auf TTC-Medium weiß
pet 409	-	0	6	-	6	6	0	auf TTC-Medium weiß
pet 410	-	0	17	-	6	21	0	auf TTC-Medium weiß
pet 411	-	0	28	-	4	28	1	auf TTC-Medium hellrot
pet 412	-	21	51	-	96	39	45	auf TTC-Medium hellrot
pet 413	-	38	66	87	83	45	3	auf TTC-Medium hellrot
pet 414	-	0	40	-	11	42	15	auf TTC-Medium weiß
pet 415	-	36	41	-	0	52	0	auf TTC-Medium hellrot
pet 416	-	0	13	-	14	32	0	auf TTC-Medium weiß
pet 417	-	6	21	-	9	51	1	auf TTC-Medium weiß
pet 418	-	12	23	-	11	38	0	auf TTC-Medium hellrot
pet 419	-	0	9	22	11	22	10	auf TTC-Medium weiß
pet 420	-	0	11	-	6	10	1	auf TTC-Medium hellrot
pet 421	-	82	111	-	74	80	132	auf TTC-Medium dunkelrot
pet 422	-	25	45	-	40	45	45	auf TTC-Medium dunkelrot
pet 423	-	27	54	-	26	50	2	auf TTC-Medium hellrot
pet 424	-	39	85	-	15	85	86	auf TTC-Medium hellrot
pet 425	-	25	138	-	90	151	169	auf TTC-Medium weiß
pet 426	-	16	44	-	11	39	1	auf TTC-Medium hellrot
pet 427	-	19	37	-	38	45	18	auf TTC-Medium hellrot
pet 428	-	0	8	15	20	25	2	auf TTC-Medium weiß
pet 429	-	31	72	-	11	73	5	auf TTC-Medium weiß

pet 430	-	48	81	-	42	72	15	
pet 431	-	85	103	-	46	96	22	
pet 432	-	15	62	-	47	38	20	
pet 433	-	44	66	-	26	68	9	
pet 434	-	71	112	-	60	107	21	
pet 435	-	11	56	-	21	37	8	
pet 436	-	39	68	-	27	57	11	
pet 437	-	12	31	-	6	32	2	
pet 438	-	29	58	-	21	65	10	
pet 439	-	0	22	-	17	20	4	
pet 440	-	48	79	-	42	105	23	
pet 441	-	75	123	-	54	110	22	
pet 442	-	26	57	-	17	68	12	
pet 443	-	37	78	-	36	64	15	
pet 444	-	15	62	-	51	52	18	

Mutante, Laborbezeichn.	pet Nr.	Ausgangsstamm	Induktion	Zeit	Anreicherungs- verfahren	Paarungstyp	Auxotrophie	Wachstum auf Glycerin	genetische Analyse
RD 5 CoCl ₂ II	pet 445	972h	32P/F	3h	Co2mM	h	wt	-	-
RD TTC I 5 L	pet 446	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 8	pet 447	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 12	pet 448	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 24 R	pet 449	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 46	pet 450	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 49 R	pet 451	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 57	pet 452	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 66 R	pet 453	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 67	pet 454	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 68 R	pet 455	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 69	pet 456	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 70	pet 457	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 72	pet 458	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 73 R	pet 459	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 86	pet 460	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 87 R	pet 461	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 104 R	pet 462	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 105	pet 463	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 106	pet 464	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 110	pet 465	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 112 R	pet 466	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 113	pet 467	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 117	pet 468	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 119	pet 469	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 120	pet 470	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 121	pet 471	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 122	pet 472	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 123 R	pet 473	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 124 R	pet 474	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 125	pet 475	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 128 R	pet 476	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 129 R	pet 477	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 132 R	pet 478	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 135 R	pet 479	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 136 L R	pet 480	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 137	pet 481	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 138	pet 482	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 140 R	pet 483	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 142 R	pet 484	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 145	pet 485	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 146	pet 486	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 149	pet 487	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 150	pet 488	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 153	pet 489	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 157	pet 490	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 201 R	pet 491	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-
RD TTC I 205	pet 492	972h	32P/F	3h	TTC	h	wt	-	-

pet Nr.	NADH-Cyt. c- Reduktase	Succ. -Cyt. c- Reduktase	Succ. -Cyt. c- Reduktase+PMS	CoQ-Cyt. c- Reduktase	NADH-Menadion- Reduktase	Succ. -Menadion- Reduktase	Cytochrom- oxidase	Bemerkungen
pet 445	-	44	68	-	-	-	0	
pet 446	-	65	92	-	23	52	69	
pet 447	-	0	10	-	9	11	1	Flockenbildung
pet 448	-	0	26	-	11	19	3	Flockenbildung
pet 449	-	38	36	-	8	13	64	
pet 450	-	0	57	-	0	100	25	
pet 451	-	0	18	-	8	29	66	
pet 452	-	35	63	-	33	60	41	
pet 453	-	33	29	-	31	25	56	
pet 454	-	39	46	-	13	38	60	
pet 455	-	30	70	-	14	40	91	
pet 456	-	14	65	-	3	29	59	
pet 457	-	44	69	-	53	38	74	
pet 458	-	62	73	-	13	53	50	
pet 459	-	62	78	-	10	10	79	
pet 460	-	23	106	-	51	48	66	
pet 461	-	94	100	-	-	-	78	
pet 462	-	0	44	-	86	44	81	
pet 463	-	0	15	-	73	14	0	Flockenbildung
pet 464	-	0	4	-	3	3	0	Flockenbildung
pet 465	-	50	77	-	13	28	69	
pet 466	-	30	37	-	17	40	65	
pet 467	-	0	20	-	6	14	0	Flockenbildung
pet 468	-	35	84	-	16	32	58	
pet 469	-	91	113	-	-	-	101	
pet 470	-	108	111	-	13	41	105	
pet 471	-	12	51	-	68	61	54	
pet 472	-	16	43	-	34	51	70	
pet 473	-	70	109	-	-	-	69	
pet 474	-	74	85	-	-	-	73	
pet 475	-	97	96	-	-	-	54	
pet 476	-	83	111	-	-	-	84	
pet 477	-	91	108	-	-	-	118	
pet 478	-	8	99	-	19	47	58	
pet 479	-	103	100	-	-	-	57	
pet 480	-	50	68	-	8	32	65	
pet 481	-	82	99	-	81	49	87	
pet 482	-	76	99	-	-	43	56	
pet 483	-	76	116	-	-	-	116	
pet 484	-	50	92	-	-	-	67	
pet 485	-	20	49	-	11	8	2	Flockenbildung
pet 486	-	0	18	-	27	47	37	
pet 487	-	68	98	-	49	41	94	
pet 488	-	64	79	-	30	46	44	
pet 489	-	76	100	-	-	-	74	
pet 490	-	70	104	-	28	41	103	
pet 491	-	71	80	-	70	59	71	
pet 492	-	0	13	-	-	-	4	Flockenbildung

Mutante, Laborbezeichn.	pet Nr.	Ausgangs- stamm	Induktion	Zeit	Anreicherungs- verfahren	Paarungstyp	Auxotrophie	Wachstum auf Glycerin	genetische Analyse
S 1	pet 493	972h ⁻	spontan		-	h ⁻	wt	-	-
S 3	pet 494	32h ⁻	spontan		TTC	h ⁻	leul	-	-
S 7	pet 495	32h ⁻	spontan		TTC	h ⁻	leul	-	-
S 8	pet 496	32h ⁻	spontan		TTC	h ⁻	leul	1	-
S 9	pet 497	32h ⁻	spontan		TTC	h ⁻	leul	-	R
S 10	pet 498	32h ⁻	spontan		TTC	h ⁻	leul	-	-
S 11	pet 499	32h ⁻	spontan		TTC	h ⁻	leul	-	-
S 12	pet 500	32h ⁻	spontan		TTC	h ⁻	leul	-	-
S 15	pet 501	32h ⁻	spontan		TTC	h ⁻	leul	-	-
S 16	pet 502	32h ⁻	spontan		TTC	h ⁻	leul	-	-

ICR unv. 2	pet 503	50h ⁻	ICR/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
ICR unv. 3	pet 504	50h ⁻	ICR/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
ICR unv. 4	pet 505	50h ⁻	ICR/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
ICR unv. 5	pet 506	50h ⁻	ICR/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
ICR unv. 6	pet 507	50h ⁻	ICR/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
ICR unv. 7	pet 508	50h ⁻	ICR/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
ICR unv. 8	pet 509	50h ⁻	ICR/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-

DIÄ unv. 3	pet 510	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ unv. 4	pet 511	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ unv. 5	pet 512	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ unv. 6	pet 513	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ unv. 7	pet 514	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ unv. 8	pet 515	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ unv. 9	pet 516	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ unv. 10	pet 517	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ 1:10 3	pet 518	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ 1:10 4	pet 519	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ 1:10 5	pet 520	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ 1:10 6	pet 521	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ 1:10 7	pet 522	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ 1:10 8	pet 523	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ 1:10 9	pet 524	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ 1:10 10	pet 525	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ 1:100 3	pet 526	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ 1:100 4	pet 527	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ 1:100 6	pet 528	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ 1:100 7	pet 529	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ 1:100 8	pet 530	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ 1:100 9	pet 531	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-
DIÄ 1:100 10	pet 532	50h ⁻	DIÄ/P	3d	TTC	h ⁻	ade7	-	-

pet Nr.	NADH-Cyt. c- Reduktase	Succ. -Cyt. c- Reduktase	Succ. -Cyt. c- Reduktase+PMS	CoQ-Cyt. c- Reduktase	NADH-Menadion- Reduktase	Succ. -Menadion- Reduktase	Cytochrom- oxidase	Bemerkungen
pet 493	-	-	-	-	-	-	-	R. -Test:stabil
pet 494	-	-	-	-	-	-	-	R. -Test:stabil
pet 495	-	-	-	-	-	-	-	R. -Test:stabil
pet 496	-	-	-	-	-	-	-	
pet 497	-	0	17	-	13	11	10	revertiert stark
pet 498	-	0	11	-	6	17	0	R. -Test:stabil
pet 499	-	-	-	-	-	-	-	revertiert stark
pet 500	-	-	-	-	-	-	-	R. -Test:stabil
pet 501	-	0	20	-	11	18	0	
pet 502	-	-	-	-	-	-	-	R. -Test:stabil

pet 503	43	76	112	-	96	113	73
pet 504	94	91	100	-	175	87	190
pet 505	133	116	109	-	106	96	143
pet 506	94	162	150	-	62	95	142
pet 507	61	163	167	-	67	94	145
pet 508	101	168	149	-	80	107	196
pet 509	72	142	141	-	78	107	133

pet 510	30	135	177	-	141	138	102
pet 511	60	79	79	-	190	128	90
pet 512	60	53	86	-	177	120	91
pet 513	63	72	86	-	92	104	67
pet 514	34	96	122	-	160	141	88
pet 515	96	105	122	-	71	101	173
pet 516	86	72	74	-	57	74	164
pet 517	95	79	91	-	42	123	107
pet 518	38	40	70	-	62	80	27
pet 519	16	15	21	-	123	63	22
pet 520	103	69	101	-	116	118	80
pet 521	75	74	76	-	77	77	70
pet 522	115	90	115	-	131	97	107
pet 523	-	112	116	-	43	87	134
pet 524	116	-	-	-	116	83	106
pet 525	108	-	-	-	61	90	140
pet 526	58	-	-	-	53	80	28
pet 527	112	82	87	-	139	87	104
pet 528	122	98	109	-	118	118	131
pet 529	119	73	100	-	133	119	85
pet 530	66	70	61	-	92	84	158
pet 531	84	64	66	-	72	110	215
pet 532	97	80	126	-	50	81	150

Mutante, Laborbezeichn.	pet Nr.	Ausgangs- stamm	Induktion	Zeit	Anreicherungs- verfahren	Paarungstyp	Auxotrophie	Wachstum auf Glycerin	genetische Analyse
MMS unv. 3	pet 533	50h ₁	MMS/P	3d	TTC	h ₁	ade7	-	-
MMS unv. 4	pet 534	50h ₁	MMS/P	3d	TTC	h ₁	ade7	-	-
MMS unv. 5	pet 535	50h ₁	MMS/P	3d	TTC	h ₁	ade7	-	-
MMS unv. 6	pet 536	50h ₁	MMS/P	3d	TTC	h ₁	ade7	-	-
MMS unv. 7	pet 537	50h ₁	MMS/P	3d	TTC	h ₁	ade7	-	-
MMS unv. 8	pet 538	50h ₁	MMS/P	3d	TTC	h ₁	ade7	-	-
MMS unv. 9	pet 539	50h ₁	MMS/P	3d	TTC	h ₁	ade7	-	-
MMS unv. 10	pet 540	50h ₁	MMS/P	3d	TTC	h ₁	ade7	-	-

pet Nr.	NADH-Cyt. c - Reduktase	Succ. -Cyt. c - Reduktase	Succ. -Cyt. c - Reduktase+PMS	CoQ-Cyt. c - Reduktase	NADH-Menadion - Reduktase	Succ. -Menadion - Reduktase	Cytochrom - oxidase
pet 533	119	179	168	-	133	157	114
pet 534	77	90	95	-	148	110	107
pet 535	19	80	105	-	102	160	84
pet 536	134	172	183	-	158	167	98
pet 537	85	116	149	-	153	100	135
pet 538	111	109	98	-	39	90	99
pet 539	103	85	106	-	111	80	105
pet 540	159	185	201	-	68	129	166

Tabelle 11

Zusammenfassung der biochemischen und genetischen Charakterisierung von Revertanten zweier cytochromoxidase-defekter Mutanten von Schizosaccharomyces pombe.

Mutante bzw. Revertante	Induktion	Zeit	Succ. -Cyt. c- Reduktase	Succ. -Cyt. c- Reduktase+PMS	NADH-Menadion- Reduktase	Succ. -Menadion- Reduktase	Cytochrom- oxidase	Rückkreuzung mit 975h ⁺ wt			
								RC	RD	gesamt	%RD
UV 1	UV	150''	48	44	47	49	1	-	-	-	-
UV 1 R1	NG	35'	48	44	46	49	37	1034	0	1034	0
UV 1 R2	NG	35'	42	50	40	42	24	2035	0	2035	0
UV 1 R3	NG	35'	106	109	102	104	93	1800	0	1800	0
UV 1 R4	NG	35'	44	107	97	93	109	1734	0	1734	0
UV 1 R5	NG	35'	45	55	51	57	103	1864	0	1864	0
UV 1 R6	NG	35'	46	64	67	67	39	1812	0	1812	0
UV 1 R7	NG	35'	45	74	45	73	71	1203	0	1203	0
UV 1 R8	NG	35'	88	104	87	87	86	504	0	504	0
UV 1 R9	NG	35'	86	108	95	92	46	1605	0	1605	0
UV 1 R10	NG	35'	42	48	48	49	47	1760	0	1760	0
NG 186	NG	30'	19	27	-	-	0	-	-	-	-
NG 186 R1 spontan			19	35	-	-	20	1043	0	1043	0
NG 186 R2 spontan			19	36	-	-	25	1681	0	1681	0
NG 186 R3 spontan			19	35	-	-	26	2793	0	2793	0
NG 186 R4 spontan			20	36	-	-	19	1635(\$)	0	1635	0
NG 186 R5 spontan			19	30	-	-	18	1013	193	1206	16
NG 186 R6 spontan			-	-	-	-	25	836	0	836	0
NG 186 R7 spontan			19	35	-	-	20	458	40	498	8
NG 186 R8 spontan			19	37	-	-	18	1264	205	1469	14

(\$)

 832 größere und 803 kleinere Kolonien auf Glycerin

Alle Enzymaktivitäten sind durchwegs in Prozent der Wildtyp-aktivität angegeben.

Tabelle 12

Tetradenanalyse der Doppelmutante pet 226 von Schizosaccharomyces pombe und ihrer F 1 im Rückkreuzungsverfahren.

Aufspaltung RC : RD	4 : 0	3 : 1	2 : 2	1 : 3	0 : 4
pet 226h ⁻ x 47h ⁺ ade6	0	0	3	3	9
pet 226h ⁺ x 47h ⁻ ade6	0	0	1	0	1
pet 226h ⁻ x 47h ⁺ ade6					
Ascus 11 (0 RC:4 RD)					
Spore a x 47h ⁺ ade6	0	0	8	0	0
Spore b x 47h ⁺ ade6	0	0	10	0	0
Spore c x 47h ⁻ ade6	0	0	8	0	0
Spore d x 47h ⁻ ade6	0	0	1	0	0
pet 226h ⁻ x 47h ⁺ ade6					
Ascus 1 (0 RC:4 RD)					
Spore a x 88h ⁺ his2	0	0	8	1	0
Spore b x 47h ⁻ ade6	0	0	3	1	0
Spore c x 88h ⁺ his2	0	0	9	0	0
Spore d x 47h ⁻ ade6	0	0	2	0	0

Angegeben ist die Zahl der Tetraden der verschiedenen Aufspaltungstypen.

Tabelle 13

Biochemische Charakterisierung der Nachkommensporen aus Rückkreuzungen der Doppelmutante pet 226 von Schizosaccharomyces pombe mit dem Wildtyp.

	Cytochrom- oxidase %wt-Aktivität	Succ. -Cyt. c- Reductase %wt-Aktivität	Succ. -Cyt. c- Reductase+PMS %wt-Aktivität
47h ⁺ ade6	100	100	100
pet 226h ⁻	0	0	54
pet 226h ⁻ x 47h ⁺ ade6			
Ascus 7 (2 RC: 2 RD)			
Spore a (RD)	0	0	54
Spore b (RD)	0	0	50
Spore c (RC)	98	108	103
Spore d (RC)	96	106	98
pet 226h ⁺ x 47h ⁻ ade6			
Ascus 14 (2 RC: 2 RD)			
Spore a (RD)	0	0	56
Spore b (RD)	0	0	54
Spore c (RC)	96	101	101
Spore d (RC)	92	100	104
pet 226h ⁻ x 47h ⁺ ade6			
Ascus 5 (0 RC: 4 RD)			
Spore a (RD)	2	0	54
Spore b (RD)	0	52	83
Spore c (RD)	1	0	52
Spore d (RD)	0	49	85

Tabelle 14

Zusammenfassung der enzymatischen Untersuchungen an stabilen
Diploiden aus je zwei cytochromoxidase- defekten Mutanten von
Schizosaccharomyces pombe.

	Succ. -Cyt. c - Reduktase %wt-Aktivität	Succ. -Cyt. c - Reduktase+PMS %wt-Aktivität	Cytochrom- oxidase %wt-Aktivität
Wildtyp 50 h ⁺	100	100	100
Haploide Ausgangsstämme			
UV 1 (pet 4)	48	44	1
UV 7b (pet 10)	71	67	1
UV 26 (pet 29)	15	19	0
UV 29 (pet 32)	14	22	1
Kreuzung			
UV 1 h ⁻ x UV 29 h ⁺ =			
pet 4 h ⁻ x pet 32 h ⁺			
Diploide			
UV 1 - 29/1h ⁻ h ⁻	54	73	78
UV 1 - 29/2h ⁻ h ⁻	50	77	77
UV 1 - 29/4h ⁻ h ⁻	50	73	77
UV 1 - 29/5h ⁻ h ⁻	55	78	79
UV 1 - 29/6h ⁻ h ⁻	55	79	80
UV 1 - 29/7h ⁻ h ⁻	55	78	72
UV 1 - 29/9h ⁻ h ⁻	51	74	74
UV 1 - 29/11h ⁻ h ⁻	50	74	74
UV 1 - 29/14h ⁺ h ⁺	56	70	80
UV 1 - 29/16h ⁺ h ⁺	53	76	79
UV 1 - 29/19h ⁻ h ⁻	52	73	79
UV 1 - 29/20h ⁻ h ⁻	53	70	72
UV 1 - 29/23h ⁻ h ⁻	58	77	79
UV 1 - 29/24h ⁻ h ⁻	56	78	76
Durchschnitt	53	75	77

Tabelle 14

Zusammenfassung der enzymatischen Untersuchungen an stabilen Diploiden aus je zwei cytochromoxidase- defekten Mutanten von Schizosaccharomyces pombe

	Succ. -Cyt. c- Reduktase %wt-Aktivität	Succ. -Cyt. c- Reduktase+PMS %wt-Aktivität	Cytochrom- oxidase %wt-Aktivität
Kreuzung			
UV 1 h^+ x UV 26 h^- =			
pet 4 h^+ x pet 29 h^-			
Diploide			
UV 1 - 26/3 h^+h^+	50	66	78
UV 1 - 26/4 h^+h^+	60	61	79
UV 1 - 26/5 h^+h^+	58	62	70
UV 1 - 26/6 h^+h^+	58	66	77
UV 1 - 26/9 h^+h^+	52	67	77
UV 1 - 26/10 h^+h^+	55	61	75
UV 1 - 26/11 h^-h^-	56	63	76
UV 1 - 26/12 h^-h^-	58	63	70
UV 1 - 26/16 h^+h^+	54	66	73
UV 1 - 26/18 h^+h^+	53	66	70
Durchschnitt	55	64	75

Tabelle 14

Zusammenfassung der enzymatischen Untersuchungen an stabilen
Diploiden aus je zwei cytochromoxidase- defekten Mutanten von
Schizosaccharomyces pombe

	Succ. -Cyt. c- Reduktase %wt-Aktivität	Succ. -Cyt. c- Reduktase +PMS %wt-Aktivität	Cytochrom- oxidase %wt-Aktivität
Kreuzung			
UV 7b h ⁻ x UV 26 h ⁺ =			
pet 10 h ⁻ x pet 29 h ⁺			
Diploide			
UV 7b - 26/2h ⁻ h ⁻	58	69	69
UV 7b - 26/3h ⁻ h ⁻	52	61	69
UV 7b - 26/4h ⁺ h ⁺	51	69	68
UV 7b - 26/5h ⁺ h ⁺	59	65	69
UV 7b - 26/9h ⁺ h ⁺	59	61	69
UV 7b - 26/10h ⁺ h ⁺	60	65	71
UV 7b - 26/11h ⁻ h ⁻	54	60	65
UV 7b - 26/15h ⁻ h ⁻	52	60	63
UV 7b - 26/18h ⁺ h ⁺	60	62	69
UV 7b - 26/20h ⁻ h ⁻	61	62	68
UV 7b - 26/21h ⁺ h ⁺	51	58	65
Durchschnitt	56	63	68

Tabelle 14

Zusammenfassung der enzymatischen Untersuchungen an stabilen
Diploiden aus je zwei cytochromoxidase- defekten Mutanten von
Schizosaccharomyces pombe

	Succ. -Cyt. c- Reduktase %wt-Aktivität	Succ. -Cyt. c- Reduktase+PMS %wt-Aktivität	Cytochrom- oxidase %wt-Aktivität
Kreuzung			
UV 7b h^- x UV 29 h^+			
pet 10 h^- x pet 32 h^+			
Diploide			
UV 7b - 29/3 h^-h^-	45	60	66
UV 7b - 29/5 h^-h^-	44	52	65
UV 7b - 29/6 h^+h^+	43	58	67
UV 7b - 29/8 h^+h^+	43	52	64
UV 7b - 29/9 h^-h^-	45	53	62
UV 7b - 29/11 h^-h^-	44	53	64
UV 7b - 29/12 h^-h^-	43	51	63
UV 7b - 29/16 h^+h^+	42	56	65
UV 7b - 29/107 h^-h^-	48	55	64
UV 7b - 29/109 h^+h^+	44	60	64
Durchschnitt	44	55	64

Tabelle 15

Proteinwerte zu Tabelle 14

Proteinwerte (mg/ml)

zu Figur 69

50 h ⁻	19,0
UV 1 h ⁻	18,2
UV 26 h ⁻	14,5
UV 1 - 26/3h ⁺ h ⁺	19,0
UV 1 - 26/4h ⁺ h ⁺	7,5
UV 1 - 26/5h ⁺ h ⁺	15,5
UV 1 - 26/9h ⁺ h ⁺	14,0
UV 1 - 26/10h ⁺ h ⁺	15,5
UV 1 - 26/11h ⁻ h ⁻	14,0
UV 1 - 26/12h ⁻ h ⁻	14,0
UV 1 - 26/16h ⁺ h ⁺	18,0
UV 1 - 26/18h ⁺ h ⁺	29,0

zu Figur 70

50h ⁻	18,0
UV 29 h ⁻	9,0
UV 1 - 29/1h ⁻ h ⁻	16,5
UV 1 - 29/2h ⁻ h ⁻	6,5
UV 1 - 29/4h ⁻ h ⁻	20,5
UV 1 - 29/6h ⁻ h ⁻	21,0
UV 1 - 29/7h ⁻ h ⁻	18,0
UV 1 - 29/9h ⁻ h ⁻	24,0
UV 1 - 29/11h ⁻ h ⁻	20,0
UV 1 - 29/14h ⁺ h ⁺	16,5
UV 1 - 29/16h ⁺ h ⁺	7,5
UV 1 - 29/19h ⁻ h ⁻	20,5
UV 1 - 29/20h ⁻ h ⁻	20,0
UV 1 - 29/23h ⁻ h ⁻	12,0
UV 1 - 29/24h ⁻ h ⁻	21,0

zu Figur 71

50h ⁻	29,0
UV 7 h ⁻	17,6
UV 7 - 26/2h ⁻ h ⁻	17,0
UV 7 - 26/3h ⁺ h ⁺	18,5
UV 7 - 26/5h ⁺ h ⁺	17,5
UV 7 - 26/9h ⁺ h ⁺	6,0
UV 7 - 26/10h ⁺ h ⁺	22,5
UV 7 - 26/11h ⁻ h ⁻	7,5
UV 7 - 26/15h ⁻ h ⁻	16,0
UV 7 - 26/16h ⁺ h ⁺	17,0
UV 7 - 26/17h ⁻ h ⁻	17,0
UV 7 - 26/18h ⁺ h ⁺	18,0
UV 7 - 26/20h ⁻ h ⁻	18,5
UV 7 - 26/21h ⁺ h ⁺	14,5

zu Figur 72

50h ⁻	14,0
UV 7 - 29/3h ⁻ h ⁻	17,5
UV 7 - 29/5h ⁻ h ⁻	15,5
UV 7 - 29/6h ⁺ h ⁺	20,5
UV 7 - 29/7h ⁻ h ⁻	18,0
UV 7 - 29/8h ⁺ h ⁺	22,0
UV 7 - 29/9h ⁻ h ⁻	16,5
UV 7 - 29/10h ⁺ h ⁺	12,0
UV 7 - 29/11h ⁻ h ⁻	17,5
UV 7 - 29/16h ⁺ h ⁺	19,0
UV 7 - 29/107h ⁻ h ⁻	21,5
UV 7 - 29/109h ⁺ h ⁺	14,0

Tabelle 17

Zusammenstellung der im Verlauf dieser Arbeit von anderen
Autoren beschriebenen atmungsdefekten Mutanten von
Schizosaccharomyces pombe

Mutanten	Eigenschaften
RD 14	Verlust der oligomycin-
RD 15	sensitiven ATPase,
M 126	stark reduzierte partikel-
Res 4	gebundene dio- 9- sensitive
M 53	ATPase.
RD 32	Alle diese Mutanten sind
	pleiotrop und zeigen ver-
	schiedene Cytochrom-
	defizienzen.

Tabelle 17

Mutanten aus Heslot et al. (1970)

	COB1	COB2	COB4	COB7
Wachstum auf Glycerin	-	-	-	-
QO ₂ in % des Wildtyps	6	8	1	4
Cyt. a. a ₃ in exponentiellen Zellen	-	-	-	-
Cyt. a. a ₃ in stationären Zellen	+	-	+	+
genetische Analyse	x 975h ⁺ RC:RD=177:177	-	x 975h ⁺ 33 Tetraden RC:RD=2:2	x 975h ⁺ 19 Tetraden RC:RD=2:2
Mitochondrien im Elektronenmikroskop (§)	12 Mitos/Schnitt, 3 %normal, 62 %mit reduzierten Cristae, 29 %ohne Cristae 6 %aberrant	-	5 Mitos/Schnitt, 0 %normal, 10 %mit reduzierten Cristae 90 %ohne Cristae	-

(§) Wildtyp 972h⁻: 6 Mitos/Schnitt, etwa 50% normale Mitos, 50% mit reduzierten Cristae, weniger als 5 % aberrante und solche ohne Cristae.

Tabelle 18

Zusammenstellung der Proteinwerte für die in den Figuren 55 - 59
gezeigten Spektren

<u>Figur 55</u>			<u>Figur 57</u>			<u>Figur 58</u>		
UV 2 h ⁻	8,3		NG 4 h ⁺	11,4		NG 90 h ⁺	1,8	
UV 8 h ⁻	7,8		NG 6 h ⁺	6,2		NG 93 h ⁺	2,1	
UV 14 h ⁻	15,2		NG 7 h ⁺	16,4		NG 117 h ⁺	1,8	
UV 15 h ⁻	16,3		NG 14 h ⁺	21,3		NG 193 h ⁺	1,7	
UV 27 h ⁻	16,2		NG 57 h ⁺	10,3				
UV 35 h ⁻	14,1		NG 58 h ⁺	16,3				
UV 52 h ⁻	14,3		NG 68 h ⁺	14,7		<u>Figur 59</u>		
UV 57 h ⁻ 1	16,1		NG 77 h ⁺	13,4		NG 165 h ⁻	1,8	
UV 58 h ⁻ 1	14,7		NG 81 h ⁺	14,7		NG 166 h ⁻	1,7	
UV 67 h ⁻ 1	14,4		NG 83 h ⁺	9,2		NG 169 h ⁻	2,4	
UV 70 h ⁻	16,2		NG 86 h ⁺	19,4		NG 187 h ⁻	2,3	
UV 78 h ⁻	19,6		NG 98 h ⁺	17,1		NG 194 h ⁻	1,8	
			NG 187 h ⁺	27,0		NG 198 h ⁻	1,9	
						NG 199 h ⁻	1,9	
						UV 239 h ⁻	1,9	
<u>Figur 56</u>			<u>Figur 58</u>			UV 246 h ⁻	1,7	
UV 114 h ⁻	9,7		Wt 88 h ⁺	2,1		UV 247 h ⁻	1,8	
UV 116 h ⁻	9,8		NG 12 h ⁺	1,8		UV 252 h ⁻	2,1	
UV 117 h ⁻	16,2		NG 29 h ⁺	1,5		UV 253 h ⁻	2,0	
UV 118 h ⁻	8,2		NG 72 h ⁺	2,3		UV 260 h ⁻	1,9	
UV 120 h ⁻	10,0		NG 74 h ⁺	2,2		UV 264 h ⁻	1,9	
UV 125 h ⁻	9,1		NG 76 h ⁺	1,8		UV 280 h ⁻	1,9	
UV 129 h ⁻	8,8		NG 77 h ⁺	1,7		UV 286 h ⁻	1,9	
UV 261 h ⁻	10,3		NG 78 h ⁺	1,9		UV 288 h ⁻	2,0	
UV 263 h ⁻	11,8		NG 79 h ⁺	1,5				
UV 270 h ⁻	12,2		NG 80 h ⁺	1,4				
			NG 81 h ⁺	2,1				
			NG 84 h ⁺	2,2				
			NG 85 h ⁺	2,1				
			NG 86 h ⁺	1,9				

Angaben in mg Protein/ml; die Werte für die Tabellen 58 und 59
liegen erheblich niedriger, da hier das Spektrum mit zehnfacher
Verstärkung aufgezeichnet wurde.

Tabelle 19

Stabilität mitochondrialer Marker in verschiedenen petites von
Saccharomyces cerevisiae

Stamm	Marker	untersuchte Kolonien	Stabilität (%)
IL 8 - 8C/E4/1	$C^0 E^R O^0$	581	95,5
IL 8 - 8C/614/2	$C^0 E^R O^S$	392	95,2
IL 8 - 8C/D6/1	$C^R E^0 O^0$	398	70,4
IL 8 - 8C/R5/3	$C^R E^R O^0$	422	88,4
IL 16 - 10B/B5/1	$C^R E^S O^0$	870	98,4
IL 16 - 10B/B1	$C^R E^S O^0$	813	87,3
IL 828 - 4B/271/41/1	$C^0 E^0 O_1^R$	147	95,3

Tabelle 20

Zusammenfassung der enzymatischen Tests und den von ihnen
erfaßten Komplexen der Atmungskette

Enzymtest	erfaßte Komplexe
NADH - Menadion - Reduktase	I
Succinat - Menadion - Reduktase	II
NADH - Cytochrom c - Reduktase	I + III + CoQ
Succinat - Cytochrom c - Reduktase	II + III + CoQ
Succinat - Cytochrom c - Reduktase + PMS	II
Coenzym Q - Cytochrom c - Reduktase	III
Cytochrom c - Oxidase	IV

LEBENS LAUF

Geboren am 8. November 1944 in Oettingen

- | | |
|-------------|--|
| 1950 - 1954 | Volksschule in Bad Wörishofen |
| 1954 - 1963 | Oberrealschule in Mindelheim, Abschluß
mit Abitur |
| 1963 - 1969 | Studium der Fächer Genetik, Botanik,
Zoologie und Chemie an der Ludwig-Maxi-
milians-Universität in München |
| 1970 | Beginn der Doktorarbeit am Institut für
Genetik |
| 1971 | Dreimonatiger Aufenthalt bei Prof. Dr.
U. Leupold, Institut für Allgemeine
Mikrobiologie der Universität, Bern |
| 1972 | Sechsmonatiger Aufenthalt bei Prof. Dr.
P. P. Slonimski, Centre de Génétique
Moléculaire du C. N. R. S., Gif- sur-
Yvette, Frankreich |

